博士論文

たばこ乾燥葉の保存過程における糖質成分の変化および反応機構

永井 敦

2013 年

目次

第 1 章 緒言

1. 1　本研究の背景　6

1. 1. 1　植物を素材とする食品・嗜好品の品質変化　6

1. 1. 2　植物としてのタバコ, 嗜好品してのたばこ　8

1. 1. 3　葉たばこを原料とするたばこ製造プロセス　9

1. 1. 4　葉たばこの乾燥および熟成中の内容成分変化　11

1. 1. 5　たばこ乾燥葉の糖質成分　13

1. 1. 6　品質変化の観点から見た糖質成分の経時変化　15

1. 2　本研究の目的　16

1. 3　本論文の構成　17

第 2 章 たばこ乾燥葉保存中のスクロース分解挙動に関する検討

2. 1　序　20

2. 2　実験材料と方法　20

2. 2. 1　材料　20

2. 2. 2　粗酵素液の調製　21

2. 2. 3　酵素活性測定　21

2. 2. 4　糖分析法　22

2. 2. 5　水分測定　23

2. 2. 6　乾燥葉の保存試験　23

2. 3　粗酵素液中におけるスクロースの反応性　24

2. 3. 1　溶液反応モデルの構築とスクロース挙動　24

2. 3. 2　pH 依存性と温度依存性　26
2. 3. 3　速度論解析　29
2. 4　乾燥葉中スクロース経時変化とスクロース分解酵素活性の関係　31
2. 5　まとめと考察　33

第 3 章 たばこ乾燥葉に存在するフルクトオリゴ糖の同定
3. 1　序　36
3. 2　実験材料と方法　40
3. 2. 1　材料　40
3. 2. 2　乾燥葉の保存試験　40
3. 2. 3　分析検体の調製法　40
3. 2. 4　分析条件　41
3. 3　オリゴ糖分析法の確立　44
3. 3. 1　分析法の選択理由と分析前処理法　44
3. 3. 2　LC-ESI-MS/MS によるオリゴ糖のイオン化と分離　45
3. 4　たばこ葉中のオリゴ糖の検出・同定　48
3. 5　たばこ葉中のオリゴ糖の定量分析　48
3. 6　乾燥葉保存中のオリゴ糖含量変化　52
3. 7　乾燥葉保存中に生じるフルクトオリゴ糖生成現象　54
3. 8　まとめと考察　59

第 4 章 たばこ乾燥葉中で活性を示すインベルターゼ
4. 1　序　62
4. 2　実験材料と方法　63

4. 2. 1　材料　63
4. 2. 2　乾燥葉からの酵素タンパク質の抽出　63
4. 2. 3　活性炭処理と限外濾過　64
4. 2. 4　イオン交換クロマトグラフィー　64
4. 2. 5　レクチン担体固定化クロマトグラフィー　65
4. 2. 6　ゲル濾過マトグラフィー　65
4. 2. 7　葉たばこからの酵素液の調製とゲル濾過クロマトグラフィー　65
4. 2. 8　酵素活性測定　66
4. 2. 9　フルクトオリゴ糖分析法　67
4. 2. 10 タンパク質定量法　68
4. 2. 11 ポリアクリルアミドゲル電気泳動　68
4. 3　インベルターゼの精製　69
4. 3. 1　酵素精製　69
4. 3. 2　相対分子量に関する考察　73
4. 4　精製酵素の性質　76
4. 4. 1　基質特異性　76
4. 4. 2　フルクトース転移能　76
4. 4. 3　至適温度　79
4. 4. 4　至適 pH　79
4. 4. 5　金属イオンの影響　79
4. 4. 6　酵素の熱安定性　85
4. 5　フルクトース転移能と基質濃度の関係　87
4. 6　まとめと考察　89

第 5 章 たばこ乾燥葉中に残存する酵素活性

5. 1　序　93

5. 2　実験材料と方法　95

5. 2. 1　材料　95

5. 2. 2　粗酵素液の調製法　96

5. 2. 3　酵素活性測定条件について　97

5. 2. 4　インベルターゼ活性測定法　97

5. 2. 5　α-アミラーゼ活性測定法　97

5. 2. 6　α-グルコシダーゼ活性測定法　98

5. 2. 7　β-グルコシダーゼ活性測定法　98

5. 3　種々のたばこ乾燥葉中に残存する糖質関連酵素活性の定量　99

5. 4　まとめと考察　103

第 6 章 総括　104

参考文献　110−121

謝辞

第 1 章

緒言

1. 1　本研究の背景

1. 1. 1　植物を素材とする食品・嗜好品の品質変化

植物素材からなる食品・嗜好品は、自然の摂理に従い経時的に品質変化を起こす。その品質変化は、意図的に生じさせる場合と意図せず生じる場合がある。発酵や熟成は前者を、腐敗や劣化は後者を示す現象である。発酵および熟成中における植物素材の品質変化は、人々の嗜好や食品栄養価にしばしば影響を与える。一方、製品の腐敗や劣化は風味の変化を起こすだけでなく、時として食の安全性にまで影響を与える。従って、植物を素材とする製品・半製品の品質管理は、食品産業にとって重要である。商品となり消費に適した状態からの品質変化は、当然のことながら望ましくないため、この場合は経時変化の抑制（保存性の向上）が課題となる。

品質変化には、物理的な変化、化学的な変化、あるいは機能的、官能的な変化など、様々な視点があり得る（五明紀春, 品川弘子ら, 2006）。中でも化学的な変化は、植物素材の物性、機能、味や匂いといった官能特性の変化へと繋がる、いわば品質管理上の重要な観測出発点であると言えよう。従って、化学変化を分子レベルで捉え、そのメカニズムを理解することは品質管理の基盤技術の発展のために重要である。化学成分変化に影響を与える因子を、素材自体の状態や特性に基づく内的因子と、素材以外の要素による外的因子に分類した場合、内的因子として残存酵素、共存成分、水分活性、成分の局在状態などが挙げられ（Maharaj, V., and Sankat, C. K., 1996; Tomás-Barberán, F. A., and Espín, J. C., 2001; Moreno, F. J. *et al*., 2006）、外的因子として保存環境の温度、湿度、酸素濃度、光源の有無などが挙げられる（Negi, P. S., and Roy, S. K., 2001; Linbo, S. *et al.*, 2007）。それぞれの化学成分が何を主要因として変化しているかを解明することは、有効な品質管理法を確立するための第一歩である。

植物性食品・嗜好品の経時的な化学成分変化の一般例を次に述べる。植物性食品・嗜好品の保存中に問題となる経時変化の一つに、酵素的褐変反応がある（村田容常, 本間清一, 1998）。レタスやキャベツなどの野菜ではしばしば経時的な変色が問題となるが、これはポリフェノール酸化酵素によるフェノール性基質の酸化と、それに引き続く重合反応によって生じる（村田容常, 2007）。特に、カット野菜のような組織断面が多い加工形態の場合、成分の細胞内局在が破壊されるため褐変が促進する。これとは対照的に、酵素が関与しない褐変反応がある。還元糖とアミノ酸のような、カルボニル化合物とアミノ化合物との間で生じる非酵素的な成分間反応は、1912 年に L. C. Maillard によって明らかにされて以来、Maillard 反応（アミノカルボニル反応）として多くの食品加工工程において確認されている（Maillard, L. C., 1912）。アミノカルボニル反応は褐変のみならず、フレーバーの生成や生理活性物質の生成など、食品品質変化に大きく関与することが知られている（Hodge, J. E., 1953; Silván, J. M. *et al.*, 2006）。この分野の研究は様々な食品を対象として世界的に行われており、欧米ではビールや乳製品の褐変やフレーバーの研究が積極的になされ、日本国内では酒、しょう油、味噌などの製造保存過程における褐変とフレーバー生成などについて数多くの研究がなされてきた。非酵素的褐変反応は食品加工工程だけでなく、商品となって以降もしばしば継続して生じる（並木満夫, 松下雪郎, 1990）。前者の場合は望ましい変化といえるが、後者はたいてい劣化である。嗜好品産業における具体例として、近年ビールの保存中に生じる化学成分変化の総説が発表されている（Vanderhaegen, B. *et al.*, 2006）。ビールは貯蔵中に、その内容成分が様々な要因によって経時変化する。その変化は、前述した Maillard 反応を含め、脂質やアルコールの酸化、α酸類の酸化分解、アミノ酸とジカルボニル化合物との間で生じるストレッカー分解、カルボニル化合物のアルドール縮合など多岐

にわたる。ビールの重要な苦味成分であるイソα酸の分解や、変敗臭原因物質である(*E*)-2-ノネナールの生成は、品質劣化の主要因となるため、これらの成分を含めた化学成分の経時変化抑制技術の開発はビール産業の課題となっている。このように、植物を素材とする食品・嗜好品は保存中にその内容成分が経時変化する。そして、その成分変化の要因は、微生物による変化、酵素作用による変化、化学反応と多岐にわたる。

たばこもまた、植物を素材とする嗜好品である。葉たばこは収穫後、乾燥されてから市場に流通するまでに、一般に 1–2 年、もしくはそれ以上の長い年月がかかる。この間、化学成分は経時的に変化することが知られている。

1. 1. 2　植物としてのタバコ, 嗜好品してのたばこ

タバコはナス科タバコ属に分類され、50 以上の多くの種が確認されているが、栽培種とされているのは一般にニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）とニコチアナ・ルスチカ（*Nicotiana rustica*）の 2 種類である。本論文では断りがない場合、「タバコ」「葉たばこ」と表記した場合はニコチアナ・タバカムのことを指し、以後取り扱うものとする。本論文では、「タバコ」は植物種の概念を示し、「たばこ」は嗜好品としてのたばこの概念を示す。また、「葉たばこ」は栽培中または収穫直後のタバコの葉を示す。「製造たばこ」はタバコを素材とする製品の事を示す。「乾燥葉」についてはその定義を後述する。

タバコは人類史に深く関わる植物である。人類がいつからタバコを利用し始めたかは未だ明らかでないが、古代マヤ文明の遺跡に煙を吸う神と思しき姿が刻まれたレリーフが存在する。このレリーフが、現存する最古のたばこの記録であるため、マヤ文明が栄えた紀元 4–7 世紀には人類がタバコを扱う習慣があったと言われる。また、植物としてのタバコの起源が南アメリカのアンデス地

方であることから、たばこ文化の発祥はアメリカ大陸の古代文化にあると言われている。コロンブス到達以前から、たばこの利用形態は大きく 3 つに分けられる。すなわち、たばこ葉を燃やして煙を吸う形態（スモーキング）、たばこ葉を口腔内で咀嚼する形態（チューイング）、そして粉末状のたばこ葉を鼻腔から吸い込んで嗅ぐ形態（スナッフィング）の 3 つである。いずれの利用形態でも、タバコを乾燥・熟成して用いるという点で共通する。コロンブスがアメリカ大陸を発見した事を契機に、たばこの文化は世界中に広がったが、現在に至るまで、タバコを乾燥・熟成するという点は一貫して消費形態の基本となっている（たばこの辞典, 山愛書院, 2009）。永い歴史を経て、今日、たばこは嗜好品の一つとして人々に憩いと安らぎをもたらしている。産業としてもグローバルに発展し、世界的に多くの人々に認知される嗜好品となっている。

1. 1. 3　葉たばこを原料とするたばこ製造プロセス

本項では、紙巻たばこの製造プロセスについて述べる。1. 1. 2 で述べたように、たばこ製品にはいくつかの形態があるが、現在、世界的に主流であるのは燃焼タイプ（スモーキング）のたばこである。葉たばこは収穫されてから紙巻たばこの原料として使用されるまでに様々な工程を経る（Tso, T. C., 1999）。図 1. 1 に、葉たばこ収穫から紙巻たばこの巻上げまでの一般的な流れを示した。まず、葉たばこは収穫された後、品種に適した方法で乾燥される。葉たばこは、乾燥工程において単純に葉から水分を除去するだけでは、たばこ原料として供することができない。収穫した葉たばこを制御された環境で乾燥することによって、望ましい味や香りが生まれることが経験的に知られている。求める芳香成分が生成し、同時に味や香りを悪くする成分が極力分解し、商材として価値あるものとなることを第一義的な目的とした工程が、葉たばこの乾燥である。この点

から、葉たばこの乾燥工程は一般に“drying”ではなく“curing”と呼ばれる。乾燥された葉たばこは、葉肉部と葉脈部に分離される（スレッシング）。この葉肉部のことをラミナ（Lamina）と呼ぶ。本論文で以後「乾燥葉」と表記した場合は、断りがない限りこのラミナを示すものとする。たばこ乾燥葉の流通の仕方は国によって異なるが、乾燥葉がすぐに製品に使用されることは殆どない。一般に Curing して間もないたばこ乾燥葉は、燃焼させた時に独特の刺激を有し、消費に適さない（Terrill, T., 1974; Tso, T. C., 1999）。そのため、スレッシング後に少なくとも 1– 2 年から数年は熟成過程（aging）を経る。熟成された乾燥葉は加香、裁刻、再調湿などの様々な加工工程を経る。また、多くの場合、単一の原料で製造されることはなく、様々な品種のたばこ原料がブレンドされて製造たばこへと供される。

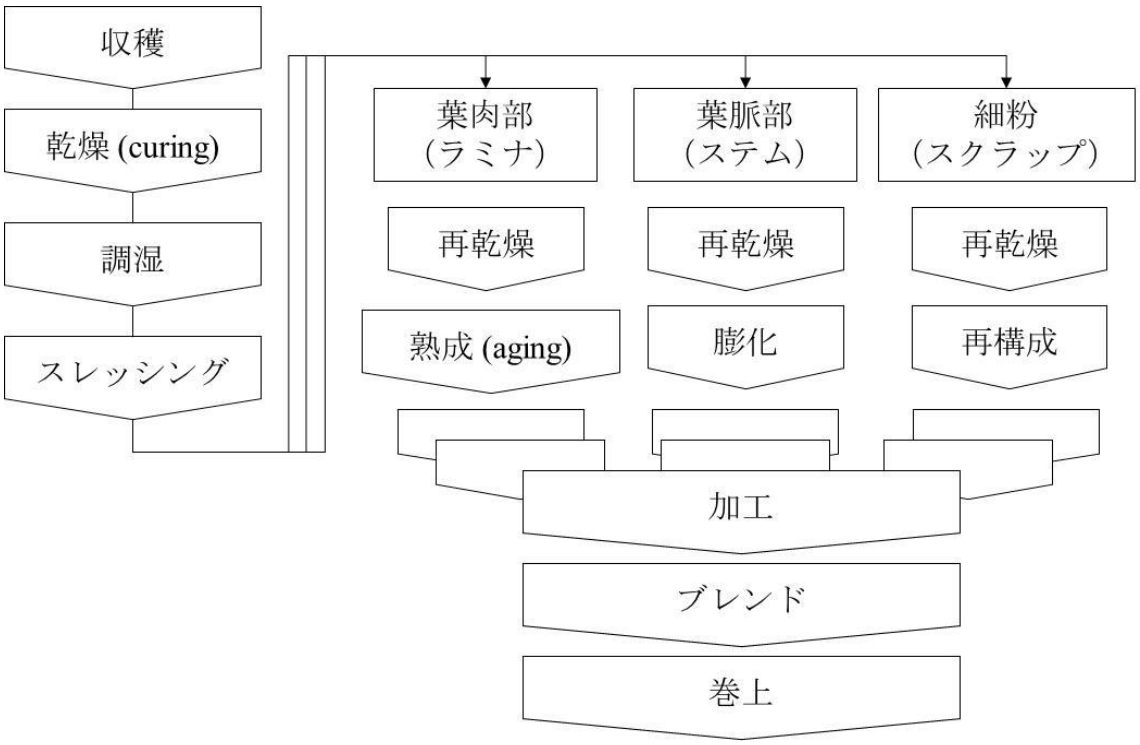


図 1. 1　典型的なたばこ製造プロセス

乾燥葉の品質は、葉たばこの品種、育成環境、栽培方法によって大きく左右されることは勿論であるが、収穫後の加工方法が品質に及ぼす影響も非常に大きい。特に葉たばこの乾燥処理（curing）は、乾燥葉品質に対する影響度が高く、たばこ文化の永い歳月の中で、品種に応じた乾燥条件が鋭意検討されてきた。葉たばこの品種には、主要なものとしてバージニア種、バーレー種、オリエント種、ほかにも産地特有品種である在来種などがある。これらは、各々の性質に適した方法で乾燥される。バージニア種は収穫後、Flue-curing と呼ばれる工程を経る。すなわち、温湿度管理された環境下、一般に 30℃−70℃に段階的に昇温する環境下で 5−7 日間かけて乾燥される（Peedin, G. F., 1999; Abubakar, Y. *et al.*, 2000）。バーレー種は収穫後、Air-curing と呼ばれる工程を経る。すなわち、直射日光が当たらない環境下で、概ね自然環境温度で 30–40 日間かけて乾燥される（Palmer, G. K., and Pearce, R. C., 1999）。オリエント種は収穫後、一日陰干しした後、Sun/air-curing と呼ばれる日光にさらしての乾燥がなされる。その後、圧搾梱包して保存されるが、この梱包内部は温度が 20–40℃、湿度が 60–70%RH になり発酵が行われる（Gilchrist, S. N., 1999）。

1. 1. 4　葉たばこの乾燥および熟成中の化学成分変化

Curing 中の葉たばこ内容成分の変化については古くから研究されており、特に 1930 年代から 1950 年代にかけて、科学的解明に向けたアプローチが幅広くなされた。これについては Frankenburg らにより総説としてまとめられている (Frankenburg, W. G., 1946A)。Curing 初期における変化は、植物の呼吸作用による変化、ならびに細胞死後は残存酵素活性による化学成分変化が主体となって生じる。代表的な成分変化として、タンパク質の加水分解があり、これに伴って一部のアミノ酸、アンモニア等の可溶性窒素成分の増加が生じる(Young, J. R.,

and Jeffrey, R. N., 1943)。デンプンは加水分解され、単糖をはじめとする低分子糖へと変換される(Abubakar, Y. *et al.*, 2000)。これらの反応は、生育中の葉たばこであれば本来生じるはずのカウンターバランスが消失することにより起こる。すなわち、これらの成分代謝は生育中とは基本的に異なるものである。加水分解反応と同時に、種々の成分は酸化によっても変化する。Curing が進むにつれて、植物生体が本来有する酸化還元系の動的平衡が失われ、葉たばこ内容成分の多くは著しく酸化されることになる。炭水化物や有機酸は、生体中の呼吸系に携わっていた一連の酵素群の影響を受けて酸化される(Pucher, G. W., and Vickery, H. B., 1949; Vickert, H. B., and Abrahams, M. D., 1949)。また、フェノール・ポリフェノール化合物、テルペノイド化合物も酸化によって分解する(Sheen, S. J., and Calvert, J., 1969; Weston, T. J., 1968; Wahlberg, I. *et al.*, 1977)。先述したとおり、たばこの Curing には品種・目的に見合ったいくつかの方法があるが、中でも Air-curing は化学成分の酸化反応を積極的に生じさせ、一方、Flue-curing は酸化作用の効果を最小限にとどめるような設計となっている。葉たばこの乾燥を制御することにより、生じる反応をコントロールして望む品質の乾燥葉を仕上げる技術、すなわち Curing 技術が今日まで引き継がれている。

葉たばこは乾燥されてからも経時的に品質変化を起こす。通常、乾燥されたばかりの葉たばこは消費に適さないことから、乾燥葉は熟成保存工程（aging）を経て品質の向上が図られる(Terrill, T., 1974; Tso, T. C., 1999)。乾燥葉の熟成中の変化として、外観変化や外香変化、物理的強度の変化などが古くから知られている。また、熟成中の化学成分変化に関する報告も過去になされている(Frankenburg, W. G., 1950B)。乾燥葉中の糖、ニコチンに代表されるアルカロイド、プロパン酸やブタン酸など一部の有機酸は熟成中に減少し、揮発性有機酸は全量として大きく増加することなどが報告されている(Frankenburg, W. G., 1950B;

Prabhu, S. and Chakraborty, M., 1986.)。

乾燥葉の成分変化の原因として、化学的な反応、酵素反応、および微生物作用が古くから示されている。乾燥葉中での酵素作用については以下の報告がある。Dixon らは、バージニア葉の熟成において、酵素作用は重要ではないと報告している(Dixon, L. F. *et al.*, 1936)。Barret らは、バーレー種とバージニア種に存在する酵素について調べ、その働きについて考察している(Barrett, R. E., 1957)。バーレー葉の aging 中に最も重要な働きをする酵素は酸化酵素であり、これらが aging 中のフェノール化合物性やアミノ態窒素の経時変化に関与していると推測している。また、バージニア種の aging 中の成分変化は化学反応が支配的であるが、decarboxylase による脱炭酸反応への影響について言及している。一方、Sun らは、curing したバージニア原料中のポリフェノールオキシダーゼ(PPO)、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)、α-アミラーゼについて測定し、熟成中の品質変化に寄与している可能性を提示している(Sun, J. *et al.*, 2010)。これらのように、熟成保存中の変化について報告があるが、いずれも化学成分変化もしくは酵素活性の測定にとどまり、その関係については推測の域を出ていない。また、報告によって結論が異なり、現在に至るまで統一的な見解が得られていない。

1. 1. 5　たばこ乾燥葉の糖質成分

たばこ葉中には多くの糖質が存在し、これらはたばこの燃焼時に生じる味・香りに関係する重要な成分である(Weeks, W. W., 1999)。一般に、糖質は不揮発性であるため、燃焼たばこにおいて主流煙にそのままの形態で移行することは殆どない(Gager, F. L. *et al.*, 1971a,b)。大部分の糖質は熱分解して種々の化合物の熱分解生成に関与するとされている(Baker, R. R., 1999)。糖質はその熱分解の過

程において、化学分解、重合、縮合、複合体形成など多くの反応にさらされる。熱分解過程に生じる生成物の組成については未解明な部分が多いが、糖質の種類によって熱分解生成物が異なることが分かっている。(Tomasik, P. *et al.*, 1989)。

グルコース、フルクトース、スクロース、マルトースは乾燥葉中に自然に存在する主要な糖質である(Leffingwell, J. C., 1999)。一般に、たばこ乾燥葉にはこれらの糖が 0– 20wt%程度含まれている。糖組成は、たばこの品種や栽培環境によって異なることが知られているが、たばこの乾燥方法が及ぼす影響は大きい。Flue-curing されたバージニア葉や Sun/air-curing されたオリエント葉は上記糖質の含有量が多く、一方 Air-curing を経たバーレー葉には単糖、二糖はほとんど含有されない(Leffingwell, J. C., 1999)。糖質が全くないたばこは、たばこ製品の製造、消費に適さないため、特にバーレー葉などには後の加工工程にて糖質が添加されることがある(Baker, R. R. *et al*., 2004a,b; Reinskje, T. *et al.*, 2006)。

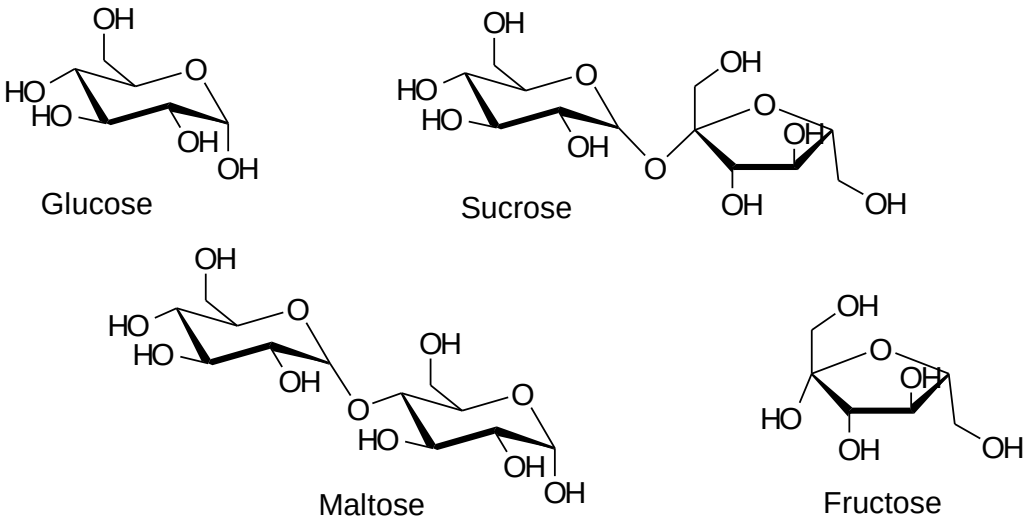


図 1. 2　乾燥葉に含まれる主な単糖・二糖類

1. 1. 6　品質変化の観点から見た糖質成分の経時変化

たばこ葉が収穫されてから乾燥、熟成される間の化学内容成分変化についてこれまでに述べたが、乾燥葉がさらなる製造プロセスを経て、製品・半製品となっても、品質変化は生じる。製品および半製品保存中の種々の内容成分変化、特に糖質を中心とした成分変化を観測していたところ、単糖類、二糖類が経時的に減少することを確認した（未発表データ）。図 1. 3 は製品に使用される原料中のスクロース含有量変化を示している。

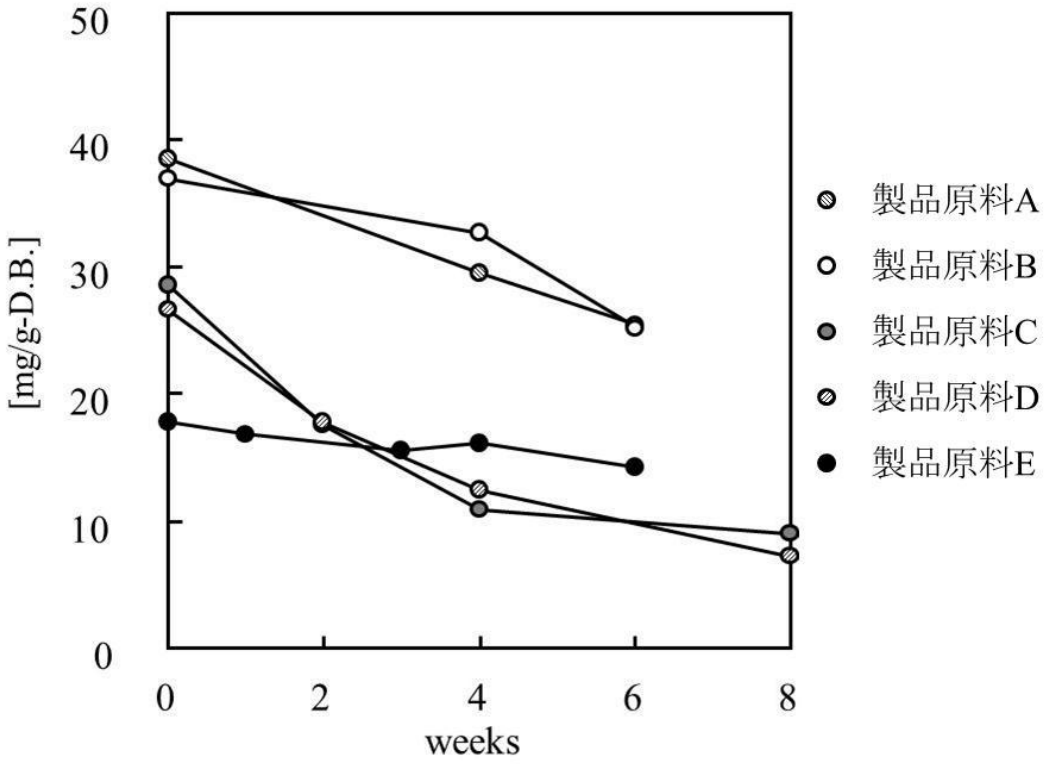


図 1. 3　たばこ製品原料の保存試験におけるスクロース含有量変化

各製品原料は、種々の乾燥葉が加工、ブレンドされたものである。

保存試験は 40℃, 60%相対湿度で 6−8 週間行った。

図 1. 3 に示したように、製品原料中のスクロースは保存中に減少する様子が伺える。ここで注目すべきことは、同一環境で保存した場合でも、製品原料によってスクロースの減少度合に差異が生じるということである。スクロースの経時変化度合に影響を与える要因については、以下の事柄が考えられる。まず、共存成分との化学反応によるスクロース減少の可能性が挙げられるが、スクロースは非還元性二糖である。グルコース、フルクトース、マルトースなどに代表される還元糖とは異なり、反応性の高い官能基構造を有さない。すなわち、先に述べた Maillard 反応による非酵素的褐変反応による消失は考えにくい。次に、微生物によってスクロースが代謝された可能性について述べる。微生物の活動指標として重要な要素に水分活性(a_w)がある（Troller, J. A. and Christian, J. H. B., 1981）。一般的な細菌が生育するには a_w 0.9 以上の環境が要求され、好塩菌や比較的乾燥に強いカビでも a_w 0.8 以上が要求される。好乾性カビの中には a_w 0.7 もしくはそれ以下で生育するものがあるが稀である。一方、今回保存試験に供したたばこ乾燥葉の水分含量は 10−12%程度と低く、その水分活性はいずれも 0.6 前後であり、一般的な微生物の活動限界以下の環境であった。ゆえに、乾燥葉保存中のスクロースの減少は微生物による代謝によって生じた可能性は低いと考えられた。

1. 2　本研究の目的

たばこ乾燥葉中の糖質は、たばこ製品の味・香りに直接関係する重要な成分群である(1. 1. 5 参照)。たばこ乾燥葉中の糖質組成は品種、栽培、乾燥法などの影響によってその組成が決定し、また、乾燥された後も熟成保存中に経時変化する(1. 1. 4 参照)。さらに、種々のたばこ製造プロセスを経て、たばこ製品となってからも、糖質は保存中に経時変化する（1. 1. 3 および 1. 1. 6 参照）。

たばこ乾燥葉の糖質組成の変化および変化メカニズムを解明することは、たばこ製品の品質管理技術の発展に必要であるだけでなく、植物を素材とする嗜好品の品質を包括的に理解する上で重要な知見となりうる(1. 1. 1 および 1. 1. 2 参照)。本論文にて著者は、スクロースの経時変化に端を発し、糖質変化メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

1. 3　本論文の構成

本論文は、第 1 章の緒言を含めて全 6 章で構成されている。以下に各章の概要について説明する。

第 2 章において、乾燥葉中のスクロースの経時変化の要因を明らかにするために、熟成後の原料を用いて種々の検討を行った。著者は、乾燥葉保存中のスクロースの減少は、残存する酵素の作用によって支配されているという仮説を基に検討を行った。まず、乾燥葉中でスクロースを分解する酵素の存在を、モデル試験系におけるスクロースの反応性、ならびに速度論解析により明らかにした。続いて、各乾燥葉が保有する酵素活性を単位重量当で数値化した。その結果、測定した乾燥葉中の残存酵素活性量と、乾燥葉保存中のスクロース減少量の間に相関関係が認められた。また、検討の過程で、スクロースの分解によって生じる構成糖の比率に一定の差異が生じることから、加水分解以外の反応スキームの存在を示した。

第 3 章では、乾燥葉中のスクロースの経時変化メカニズムをより詳細に明らかにするため、第 2 章で述べた「加水分解以外の反応スキーム」について検討を行った。具体的にはまず、LC/MS/MS による乾燥葉中オリゴ糖の新規分析法を確立した。続いて種々の乾燥葉を分析したところ、いくつかのオリゴ糖が含有されていることが判明した。同定されたオリゴ糖の一つはフルクトオリゴ糖

であり、従来まではタバコ中での存在を否定された物質であった。定量分析の結果、フルクトオリゴ糖は乾燥葉中でのみ存在することを明らかにした。

第 4 章では、たばこ乾燥葉中のフルクトオリゴ糖の生成機構について、詳細に研究した内容を報告している。タバコ植物は、過去にフルクトオリゴ糖生成能の存在を否定されている。乾燥葉中のフルクトオリゴ糖の生成メカニズムについて、酵素反応的な視点から精査し、第 3 章で述べた反応と第 2 章で示したショ糖分解活性との関連性を示した。結論として、乾燥葉中のスクロースは加水分解によって単糖へと変換されるだけではなく、副反応によって部分的に縮合反応を起こしており、フルクトオリゴ糖の生成反応に利用されている可能性を示した。

第 5 章では、糖質関連酵素に焦点を当て、品種（乾燥法）ごとの乾燥葉中に存在する糖質加水分解酵素に関する検討結果を示した。

第 6 章では、総括として本研究のまとめと今後の展望について論じた。

第 2 章

たばこ乾燥葉保存中のスクロース分解挙動に関する検討

2. 1　序

緒言 1. 1. 5 で述べたように、糖質は、乾燥葉中に存在する主要な成分群であり、たばこの燃焼時に生じる味・香りに直接関係する重要な成分である。そのため、糖質の経時変化に関する包括的な理解は、品質管理の観点から重要である。緒言 1. 1. 6 で述べた通り、乾燥葉中のスクロースを含む糖質は経時的に減少する。この現象は、乾燥葉に自然に存在するスクロースだけでなく、外部から添加した場合についても同様に生じることを著者は確認している。

スクロースは、グルコースとフルクトースがグリコシド結合によって縮合した二糖である。非還元性糖であるスクロースは、還元糖とは異なり化学的に安定である。乾燥葉の水抽出液および抽出液と同等の pH（4.5– 5.0）の緩衝液中、スクロースを 85°C で 1 時間加熱した場合でも、最大で 5%程度の分解にとどまることを著者は確認している。また、たばこ乾燥葉の水分環境（含水率 10– 12%, 水分活性 0.60– 0.65）は微生物が活動できる環境ではないため、スクロースが微生物によって代謝された可能性も低い。ここで、乾燥葉中のスクロースは酵素反応によって生じていると考えた。本章では、この仮説の検証結果について述べる。

2. 2　実験材料と方法

2. 2. 1　材料

試験検体として、バージニア種、バーレー種、オリエント種を含む 17 種類の乾燥葉を用いた。スクロース、D-フルクトース、D-グルコース、および緩衝液の作成に用いた試薬（クエン酸、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物）は和光純薬工業製の特級グレードのものを使用した。

アセトニトリルは HPLC グレードのものを和光純薬工業から購入して用いた。緩衝液や粗酵素液の調製、標準溶液の作製、HPLC 移動相の調製にあたっては、すべて比抵抗値 18.2 MΩ·cm 以上の MilliQ（Millipore Co., Bedford, MA, USA）を用いた。

2. 2. 2　粗酵素液の調製

乾燥葉を粉砕機（Nara Machinery Co., Ltd.，東京）を用いて 0.5−1.0 mm メッシュに粉砕した。粉末状原料 2.0 g をガラスバイアルに秤量し、あらかじめ氷冷しておいた 100 mL の 15mM McIlvaine 緩衝液（4.8 mM クエン酸－10.2 mM リン酸水素二ナトリウム緩衝液、pH 5.4）に懸濁した。これをホモジナイズし、さらに超音波抽出処理を 30 分間行った。抽出液を Whatmann #60 を用いて濾過し、濾液を 12,000 ×g、10 分間遠心した。上清はさらに孔径 0.2 μm のセルロースアセテートメンブレン（Whatmann, GE Healthcare UK Ltd.）を用いて濾過した。濾液 60 mL を分取し、30 kDa 限外濾過膜（Amicon Ultra、遠心式限外濾過チューブ×４）を用いて低分子成分を除去するとともに高分子成分を濃縮した。高分子成分の濃縮液を抽出に用いた緩衝液によって希釈し、同様に限外濾過を行って高分子画分の洗浄操作を 2−3 回繰り返した。洗浄した濃縮液は、抽出に用いた緩衝液を用いて 12 mL にメスアップした。このメスアップした溶液を、本章では粗酵素液と定義した。pH 依存性を測定する場合は対応する pH に調整した緩衝液を用いた。一連の抽出・精製作業はすべて 4°C 以下で行った。

2. 2. 3　酵素活性測定

100 mM、pH5.0 の McIlvaine 緩衝液 200 μL と粗酵素液 120 μL をエッペンドルフチューブ内で混合し、ヒートブロックを用いて 40°C で 2 分間加温した。混合

溶液は時間変化観測用に４つ用意した。混合溶液に、0.5 M スクロース水溶液を 80 μL 加え、それぞれ 5、10、20、40 分経過時に 1.0 M 炭酸ナトリウム用溶液を 200 μL 加え、反応を停止した。至適温度や至適 pH を測定する場合は、反応の際に任意の緩衝液、任意の設定温度に変更した。酵素活性は、1 秒間に 1 nmol のグルコースを遊離させる酵素量を 1 nkat と定義した。

2. 2. 4　糖分析法

酵素反応溶液中の糖の分析は、以下に示す２つ方法で行った。

1) 2. 2. 3 にて、1.0 M 炭酸ナトリウムによって反応停止した溶液中のグルコースおよびフルクトースについて、ロシュ・アプライド・サイエンス社の F-kit Glucose（ヘキソキナーゼ法）または F-kit Glucose/Fructose（ヘキソキナーゼ法および酵素カップリング法）を用いて定量した。定量操作は F-kit のインストラクションマニュアルに従った。
2) 2. 2. 3 において、酵素反応停止時に 1.0 M 炭酸ナトリウムの代わりに、832 μL のアセトニトリルを加えて速やかに冷却した。冷却した混合液を 10 kDa 限外濾過チューブ（Amicon Ultra 4 mL）を用いて濾過した。濾液を Agilent 社製、高速液体クロマトグラフィー示差屈折率検出器（Agilent 1200 HPLC system, G1362A refractive index detector: HPLC-RID）に供し、糖組成を分析した。定量は絶対検量線法によって行った（定量範囲：0.1– 10 mg/mL）。分析条件は次の通りである。 カラム：Waters Carbohydrate Column (250×4.6 mm I.D., 4 μm) 、カラム温度：35°C、移動相：75% アセトニトリル（アイソクラティック溶出）、流量：1.0 mL/min、インジェクションボリューム：20 μL。

たばこ乾燥葉中の糖は、上と同様に HPLC-RID にて定量した。乾燥葉中の糖

の抽出および前処理手順は次の通りである。粉砕した乾燥葉 1.0 g に対して 50% アセトニトリルを 40 mL 加え、室温で 30 分 200 rpm で振とう抽出し、さらに 30 分間超音波抽出処理を行った。抽出液を孔径 0.2 μm の PVDF メンブレン（Whatmann, GE Healthcare UK Ltd.）を用いて濾過した。濾液を HPLC-RID に供し、グルコース、フルクトース、スクロースを絶対検量線法により定量した。ここで求められる含有糖量を湿物重量当の含量（Wet basis, W.B.）とした。

2. 2. 5　水分測定

乾燥葉の検体を 1.0 g 秤量し、100°C に設定したロータリーオーブン（Tsukasa Co., Ltd., Tokyo）内にて 1 時間乾燥した。乾燥後、検体はデシケーターの中で室温まで冷却した。乾燥前後での重量変化分を水分量とした。本論文において、乾燥葉中の各種成分および各種酵素活性量の乾物重量当（Dry basis, D.B.）データは、本項の方法によって得られるの水分測定値を用いて算出した。

2. 2. 6　乾燥葉の保存試験

保存試験に供する乾燥葉は、あらかじめ 22°C 、60%相対湿度（RH）環境下で 48 時間調湿した。調湿後、ポリプロピレン製容器内で、40°C, 60%RH で 4 週間保存した。

2. 3　粗酵素液中におけるスクロースの反応性

2. 3. 1　溶液反応モデルの構築とスクロース挙動

乾燥葉保存中に生じるスクロースの減少が酵素反応によって起こることを示すため、まず、モデル溶液を作製した（図 2. 1)。バーレー種の乾燥葉を検体とし、緩衝液を用いて可溶成分を抽出した。溶出された可溶成分を、限外濾過膜を用いて分子量によって分画した。各画分は、抽出物濃度が原料相当で等しくなるように設定した。

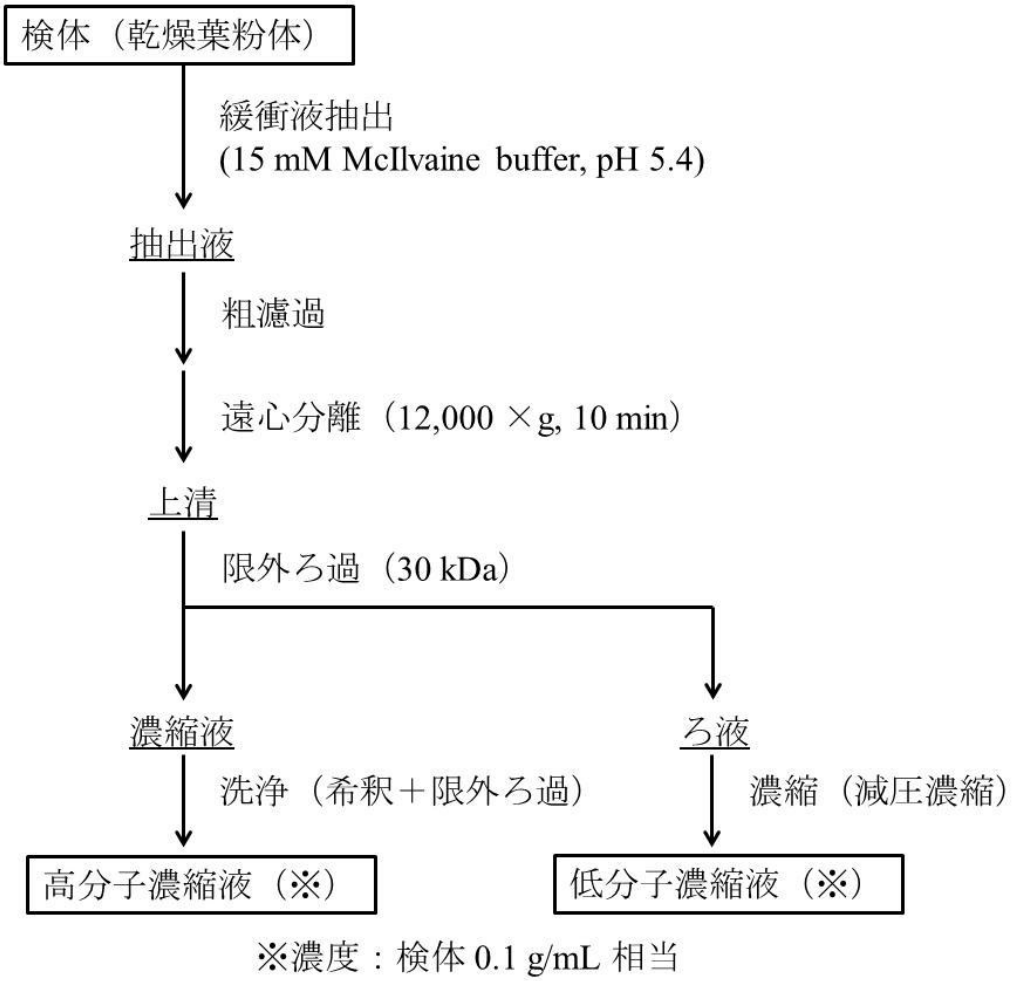


図 2. 1　モデル溶液の作製スキーム

作製したモデル溶液（高分子画分の濃縮液および低分子画分の濃縮液）に対してスクロースを 80 mM になるように加えて 40°C でインキュベートしたところ、粗酵素液中では経時的にスクロースが減少し、グルコースとフルクトースが生成した。また、分解したスクロースのモル数と生成するグルコースの量は概ね等しかった (図 2. 2 (A), (B)) 。一方、低分子濃縮液においてはスクロースの減少は認められなかった。

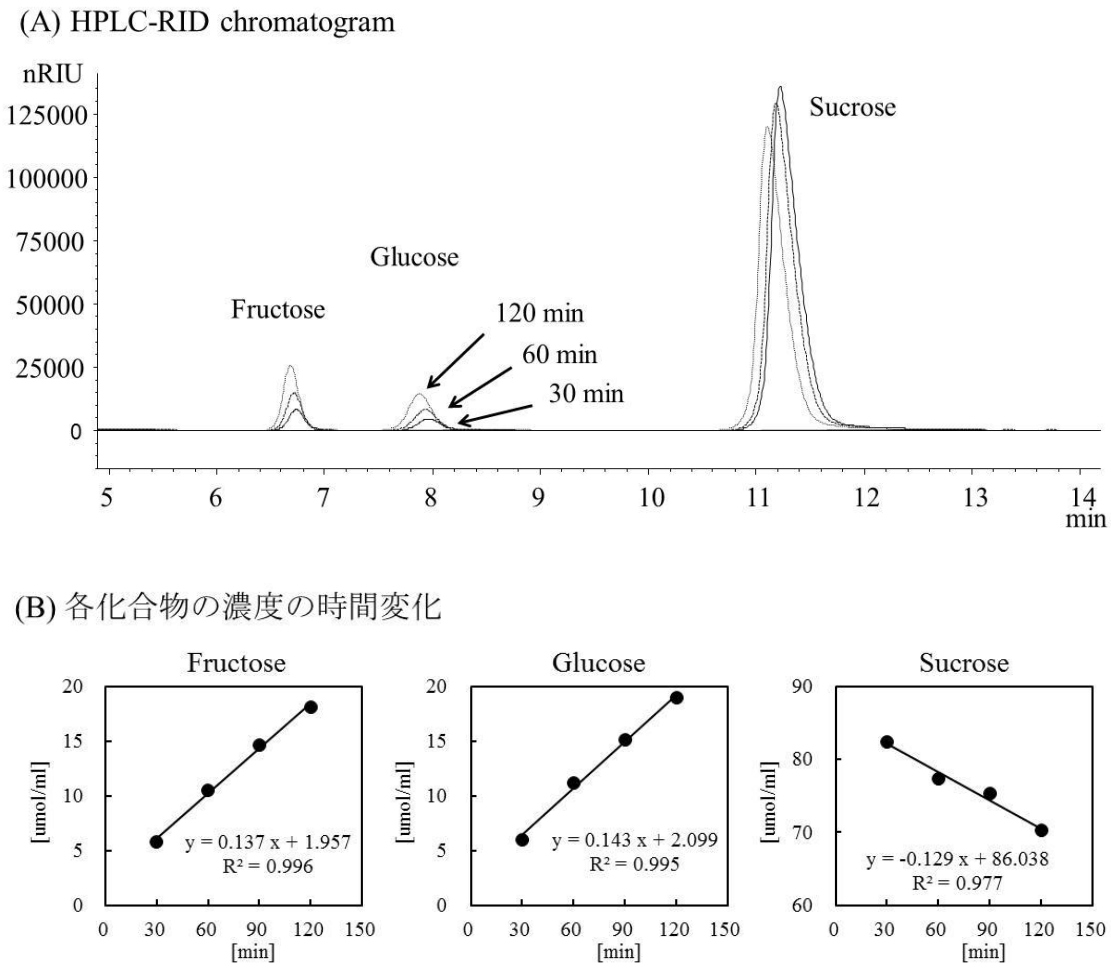


図 2. 2　高分子画分濃縮液中におけるスクロースの減少と単糖類の生成

(A) HPLC-RID クロマトグラム (B) 各化合物の時間に対する濃度変化

これらのことから、スクロースは乾燥葉中に存在する高分子成分を含む画分の影響によって単糖へと加水分解されることが示唆された。以後、高分子画分の濃縮液を粗酵素液と呼ぶ。粗酵素液作製に関する詳細は実験材料と方法の項（2. 2. 2）を参照されたい。

2. 3. 2　pH 依存性と温度依存性

粗酵素液中におけるスクロースの加水分解反応について、その反応性について検討を行った。図 2. 3 はグルコースおよびフルクトース生成速度の pH 依存性を示している。また、図 2. 4 は温度依存性を示している。

粗酵素液中におけるスクローの加水分解反応速度は、pH 5.0 付近で極大値を示した。純化学的なスクロースの加水分解（酸加水分解）は酸性度が高いほど促進し、また高温であるほど促進される。一方、今回の溶液モデル中の反応は、pH 5.0 付近、温度は 55°C で反応速度の極大値を示した。これらの結果から、本反応は酵素による触媒反応であることが強く示唆された。また、本反応系ではスクロースの分解によって生じるグルコースとフルクトースの生成量に差異が生じた。この理由については第 3 章以降で論じる。

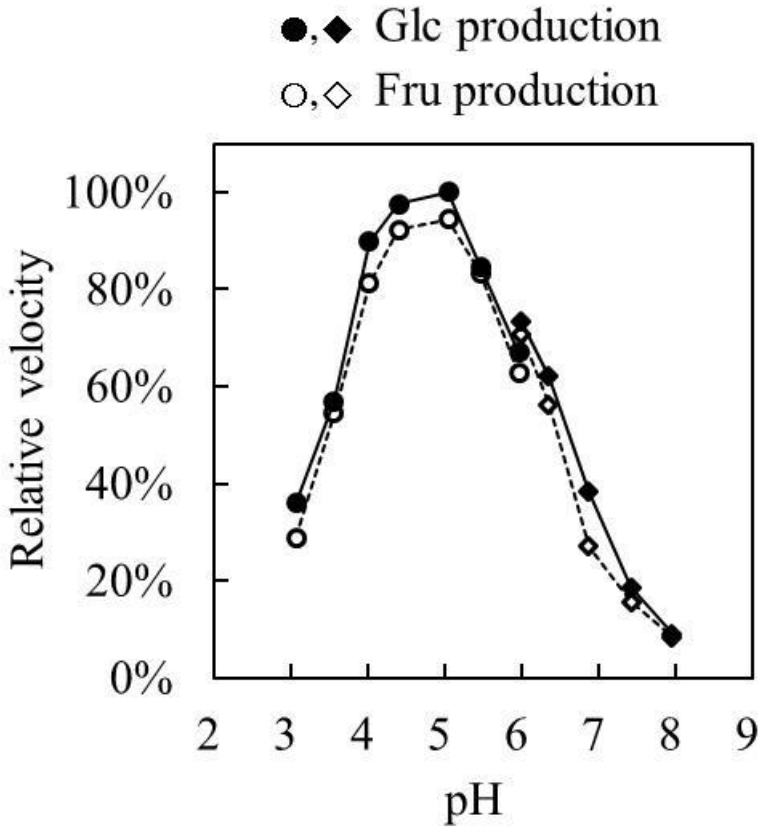


図 2. 3　粗酵素液のスクロース加水分解反応の pH 依存性（40°C）

検体としてバーレー葉（ブラジル産）を用いた。実線はグルコースの相対生成速度、破線はフルクトースの相対生成速度を示している。○および●のプロットは McIlvaine 緩衝液を用いた。◇および◆のプロットはリン酸緩衝液を用いた。なお、最大速度を示した pH でのグルコース生成速度を 100%として速度を比較した。反応開始時の基質濃度は 0.08 M、反応は 40°C で 40 分間行った。

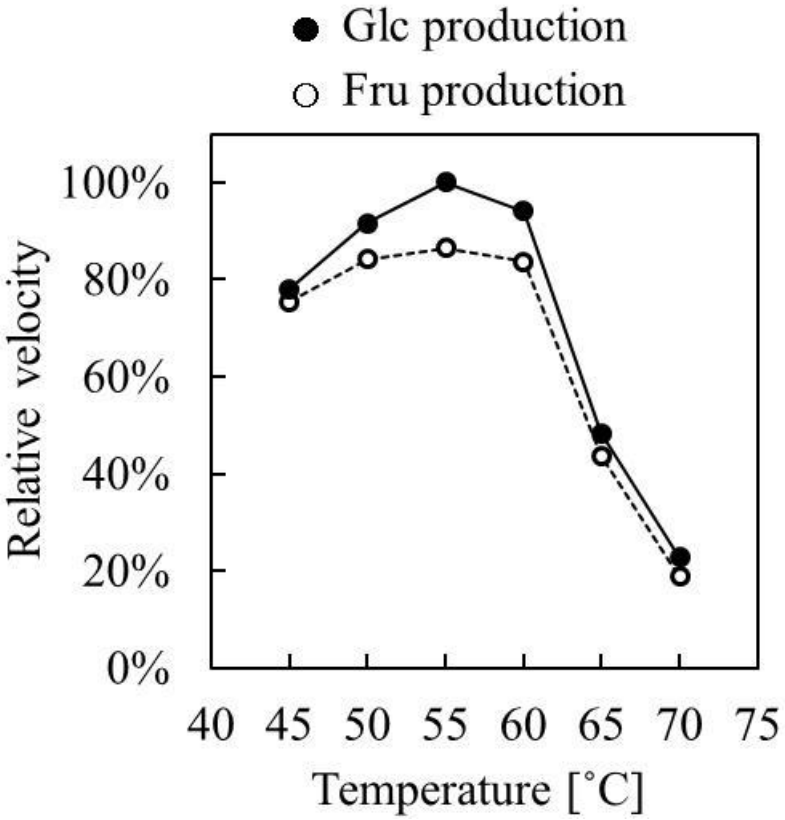


図 2. 4　粗酵素液のスクロース加水分解反応の温度依存性（pH 5.0）検体としてバーレー葉（ブラジル産）を用いた。実線はグルコースの相対生成速度、破線はフルクトースの相対生成速度を示している。なお、最大速度を示した温度でのグルコース生成速度を 100%として速度を比較した。反応開始時の基質濃度は 0.08 M、反応は McIlvaine 緩衝液（pH 5.0）中、40 分間行った。

2. 3. 3　速度論解析

モデル溶液中におけるスクロースの加水分解反応に関する速度論解析を行った結果を示す（図 2. 5)。3 種類の乾燥葉検体から、2. 2. 2 の方法を用いて粗酵素液を調製し、基質濃度と反応速度の関係を調べた。反応速度は単位時間あたりに生成するグルコース量から算出した。酵素反応は 2. 2. 3 の方法に準じて実施した。

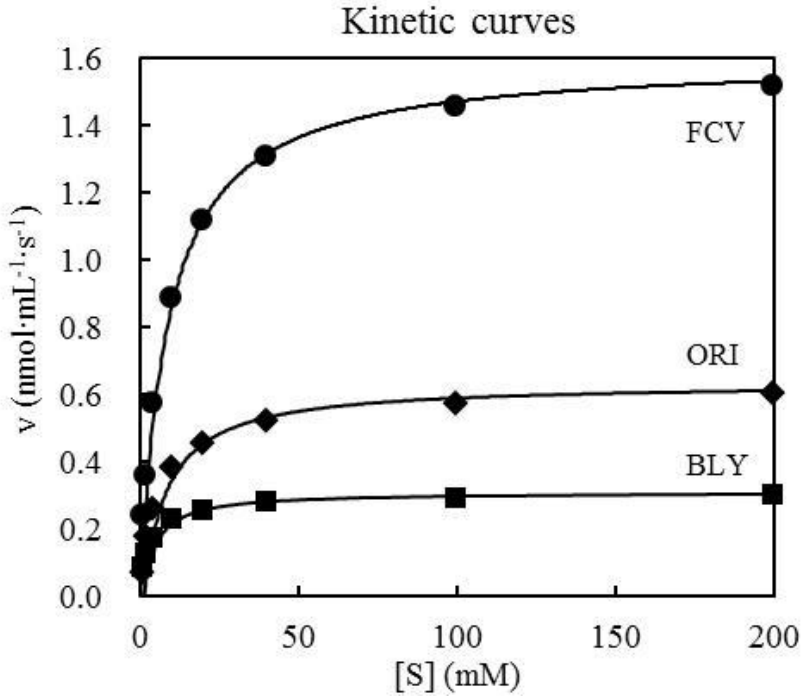


図 2. 5　反応速度曲線（[S]−v plot）

各プロットは実測値、実線は非線形回帰曲線を示している。検体としてバーレー葉（BLY, ブラジル産, 図中プロット■)、バージニア葉（FCV, ブラジル産, 図中プロット●)、オリエント葉（ORI, ギリシャ産, 図中プロット◆）を用いた。基質濃度 1, 2, 4, 10, 20, 50, 100, 200 mM にて反応を行い、単位時間当たりに生成するグルコース量から反応速度を求めた。

基質濃度の増加によりグルコース生成速度は徐々に飽和する傾向にあったことから、本反応は触媒反応である可能性が示唆された。本反応に酵素反応速度則が適用できると想定し、基質濃度[S]と各基質濃度における反応初速度 v に対して Michaelis-Menten 反応速度式による非線形回帰を行った。結果を図 2. 5 の実線で表記した。また、表 2. 1 に非線形最小二乗法によって求めた *Km* と V*max* 示した。実験は 3 回繰り返して行い、測定誤差を併せて表記した。

表2. 1　非線形回帰における各検体の*Km*およびV*max*

Leaf type	Growing district		*Km* mM	V*max* nmol/s/mL
FCV	Brazil	ave	7.29	1.58
		sd	0.28	0.04
		RSD	3.8%	2.4%
BLY	Brazil	ave	2.89	0.30
		sd	0.05	0.00
		RSD	1.7%	0.5%
ORI	Greece	ave	5.18	0.60
		sd	0.41	0.00
		RSD	7.8%	0.0%

図 2. 5 に示したように、Michaelis-Menten 反応速度式による非線形回帰曲線は実測値（各プロット）と一致し、本反応に酵素反応速度則が適用できることが示された。また、3 検体の *Km* は 2.5−7.5 の範囲にあり、基質との親和性は同等である一方、V*max* は検体によって大きな違いが見られた。反応速度が飽和する基質濃度 V*max* は、Michaelis-Menten 速度式において初期酵素濃度に依存する。換言すれば、基質濃度がほぼ飽和した時の基質分解速度を測定することにより、乾燥葉が有する酵素量を定量することができる。本項における速度論的解析結果（図 2. 5 および表 2. 1）より、本反応系ではスクロース濃度が 100 mM 近辺で

基質飽和に近づくことが分かる。ここで、スクロース濃度 100 mM の時に、1 秒間に 1 nmol のグルコースを生成させる酵素量と 1 nkat の酵素量と定義する。著者は、本試験系を用いて、乾燥葉保存中のスクロースの減少度合を説明できないかと考え以下検討を行った。

2. 4　乾燥葉中スクロース経時変化とスクロース分解酵素活性の関係

ここまでの検討から、乾燥葉から調製されたモデル溶液中において、スクロースは酵素により加水分解されることが示唆された。本項では、乾燥葉保存中に生じるスクロースの減少と、乾燥葉が保有する酵素活性との関係について論じる。

バージニア種､バーレー種､オリエント種を含む 17 種類の乾燥葉を対象とし、試験を行った。まず、各乾燥葉が有する酵素活性を 2. 2. 3 に記述した方法によって定量した。各乾燥葉の保存試験は 2. 2. 6 に記述した条件で行った。検体間の水分含量の差異が保存中のスクロース経時変化に及ぼす影響を排除するため、保存試験に供する乾燥葉は事前に 22ºC、60%湿度で一定時間調湿した。保存試験に供する検体の含水量はいずれも 10– 11%程度であった｡酵素活性およびスクロース含量はすべて乾物重量等で測定した。検体の水分測定は 2. 2. 5 に記述した方法で実施した。保存試験前後のスクロース含量残存率を保存試験前後のスクロース含量から算出した。乾燥葉中のスクロースは 2. 2. 4 に記述した方法によって定量した。

図 2. 6 は､各乾燥葉の保存試験開始時における酵素活性量と､各乾燥葉を 40°C で 4 週間保存した時のスクロース残存率の関係を示したものである。酵素活性が高い原料ほど、保存中にスクロースが著しく減少した。逆に、酵素活性が低い原料は、保存中にスクロースがほとんど減少しないことが判明した。

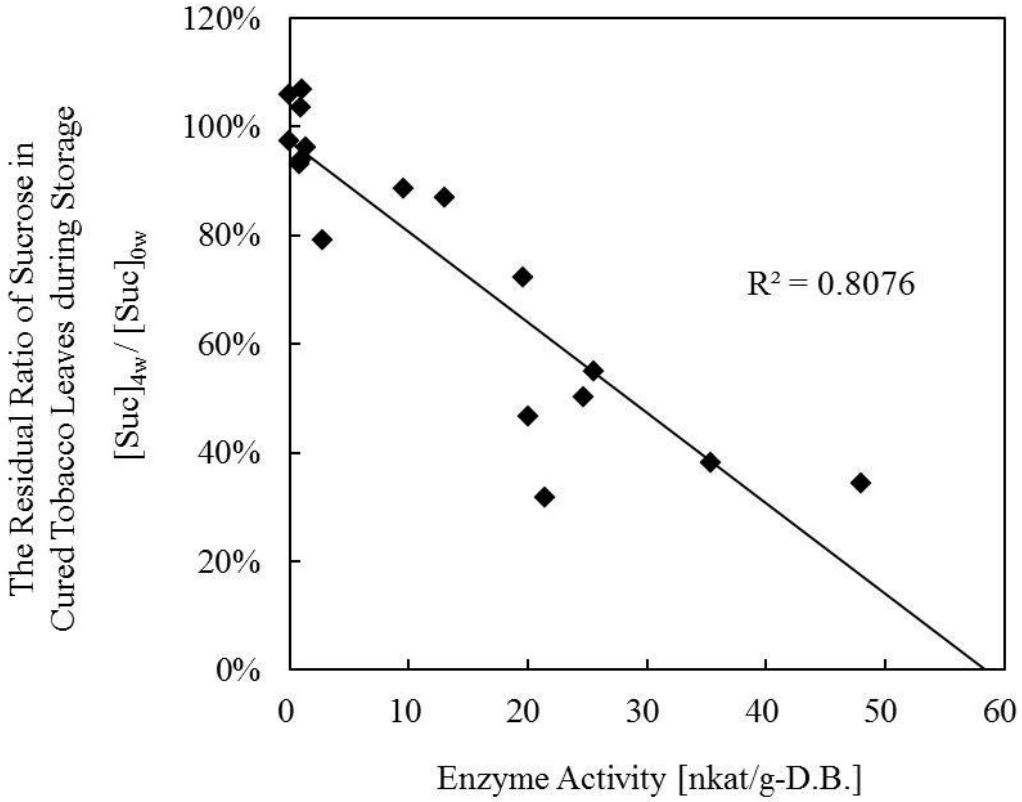


図 2. 6　酵素活性と保存中スクロース残存率の関係

横軸：各乾燥葉が保有する酵素活性量[nkat/g-D.B.]

縦軸：保存試験前後におけるスクロースの残存率(%)

$[Suc]_{0w}$: 保存試験前の乾燥葉中スクロース含有量

$[Suc]_{4w}$: 保存試験後の乾燥葉中スクロース含有量

保存試験は 40℃ で 4 週間行った。試験検体として、バージニア種、バーレー種、オリエント種を含む 17 種類の乾燥葉を用いた。

2.5　まとめと考察

本章では、乾燥葉中のスクロースが保存中に減少することに注目し、これが酵素反応によるものであると仮説を立て、それを検証した。検討の結果、スクロースの分解に寄与しているのは、乾燥葉中の高分子量の物質群であることが分かった。高分子画分を抽出・分離し、これを用いた溶液反応モデルを構築した。モデル溶液中でのスクロースの分解反応を調べたところ、pH 依存性と温度依存性を示した。至適 pH は 5.0 付近、至適温度は 50°C という極大値を示した。また、反応速度は基質濃度の増加に伴い飽和する傾向を見出したことから、触媒反応であることが分かった。これらの結果から、乾燥葉中のスクロースは化学反応ではなく酵素反応によって生じている可能性が挙げられた。この結果を受けて、スクロース分解に寄与する見かけの酵素活性を定量し、この定量値と、実際の乾燥葉保存中のスクロース残存率の関係を調査した。結果として、両者の間に高い相関が認められたことから、乾燥葉保存中のスクロースの減少は、乾燥葉が有する酵素活性に由来することが強く示唆された。

本章ではここまで、スクロースの分解反応が、加水分解によるグルコースおよびフルクトースへの変換であると論じた。しかし、溶液モデル反応においてグルコースとフルクトースの生成量に差異があり、グルコースの方が生成量として多い結果となった。また、この差異には再現性があった。生成物量に差異が生じた原因には次に挙げる理由が考えられた。仮説１）生成した単糖類が他の化学反応によって分解した。仮説２）生成したフルクトースが共存酵素によって他分子へと変換された。仮説３）スクロースは加水分解以外の反応によって他分子へと変換された。モデル溶液は pH5.0、40°C という温和な条件であり、また、共存低分子を除去した系であるため、フルクトースが化学反応によって失われた可能性は低い。また、粗酵素液にフルクトースのみを添加した場合、

フルクトースは減少しないことから仮説２の可能性も低い。そこで、第 3 章では、スクロース中のフルクトース残基が転移した可能性を考え、乾燥葉中のオリゴ糖について分析、検討した。

第 3 章

たばこ乾燥葉に存在するフルクトオリゴ糖の同定

3. 1　序

糖質は、たばこ乾燥葉の主要な内容成分の一つであり、また、たばこ煙の味・香りに関係する重要な化合物である(Leffingwell, J. C., 1999; Weeks, W. W., 1999; Baker, R. R. *et al.*, 2004; Reinskje, T. *et al.*, 2006)。乾燥葉中の糖組成を調べることは、乾燥葉の品質の包括的な理解の第一歩と言える。今日までに、葉たばこ、たばこ乾燥葉、たばこ製品に関して、その含有糖に関する幅広い研究がなされてきた(Bourne, E. J. *et al.*, 1967; Stedman, R. L., 1968; Siddiqui, I. R., and Rosa, N., 1983; Oakley, E. T., 1983; Švob Troje, Z. *et al.*, 1997; Hall, R. A., and Wooten, J. B., 1998; Clarke, M. B. *et al.*, 2006; Tang, K. *et al.*, 2007)。これらの研究の多くは、単糖、二糖、多糖に関するものである。一方、オリゴ糖に関する報告例は少なく、たばこの種子から発見されたプランテオース、葉たばこから同定されたラフィノース、スタキオースそして乾燥葉から同定されたエルロース、テアンデロースに限られる(French, D., 1955; Mizuno, T., and Kinpyo, T., 1957; Siddiqui, I. R., and Rosa, N., 1983)。

オリゴ糖は、単糖類同士がグリコシド結合によって 3 つ以上結合したものである。オリゴ糖は、構成糖、結合様式、重合度などによってその構造は多様であり、様々なオリゴ糖が植物に、藻類に、そして微生物にと、自然界に広く分布している。

フルクトオリゴ糖（FOS）は、フルクトース残基がβ結合したオリゴ糖であり、たびたび分子内に一つのグルコース残基を含んだ構造を有する。フルクトオリゴ糖には 3 つの型が報告されている。すなわち、イヌリン型、レバン型、グラミナン型である(Ritsema, T., and Smeekens, S., 2003)。重合度の高いフルクトオリゴ糖は“フルクタン”と呼ばれ、植物、藻類、微生物で見つかっている(Biggs, D. R., and Hancock, K. R., 2001; Banguela, A., and Hernández, L., 2006)。植物に関して

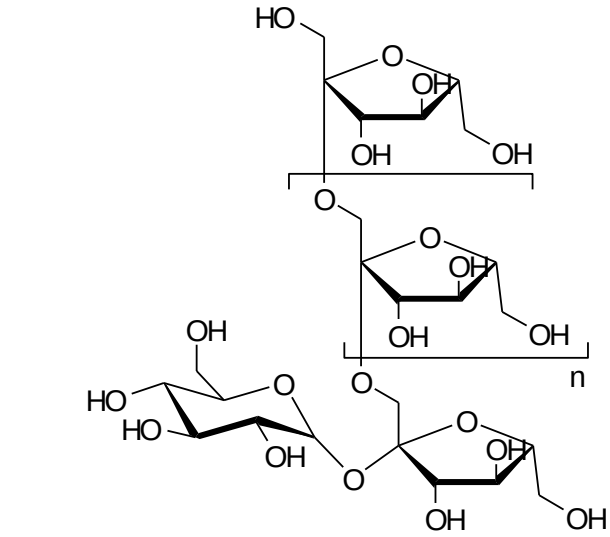
言えば、顕花植物のおよそ 15%がフルクタンを蓄積するとされている(Hendry, G. A. F., 1993)。イヌリン型（β2-1 結合型）フルクタンは、キク目に代表される双子葉植物で生成し、レバン型（β2-6 結合型）およびグラミナン型（β2-1, β2-6 複合型、枝分かれ型）のフルクタンは主に単子葉植物で生成する(Hendry, G. A. F., 1993; Ritsema, T., and Smeekens, S., 2003)。一方、タバコはノンフルクタン型植物に分類され、フルクタンを生成しない。実際、形質転換なしでは葉たばこ中にフルクタンは生成しないという報告がいくつかなされている(Pilon-Smits, E. A. H. *et al.*, 1995; Sprenger, N. *et al.*, 1997)。

マルトオリゴ糖（MOS）は、グルコース残基が α1-4 結合で縮合したオリゴ糖である。マルトースはグルコース残基が 2 つ縮合した糖であり、時にマルトオリゴ糖の一種として扱われる。マルトースは、たばこ乾燥葉中に含まれる主要な糖質の一つとして広く知られている(Stedman, R. L., 1968; Siddiqui, I. R., and Rosa, N., 1983; Švob Troje, Z. *et al.*, 1997)。しかしながら、重合度が 2 つより大きいマルトオリゴ糖に関する報告は少ない(Abbott, I. R., and Matheson, N. K., 1972)。緒言で述べたように、葉たばこの Curing において、デンプンは異化代謝される。デンプンの加水分解によって、乾燥葉中にはマルトオリゴ糖が存在する可能性がある。図 3. 1 にフルクトオリゴ糖とマルトオリゴ糖の化学構造式を示す。

フルクトオリゴ糖およびマルトオリゴ糖については、様々な分析法が報告されている。もっとも一般的な分析法の一つに、高速陰イオン交換クロマトグラフィー・パルス電流検出法（HPAEC-PAD）が挙げられる(Tabata, S., and Dohi, Y., 1992; Campbell, J. M. *et al.*, 1997; Hogarth, A. J. C. L. *et al.*, 2000)。HPAEC-PAD はオリゴ糖の分離、定量のための優れた技術であるが、煩雑な検体精製がしばしば必要となり、また、クロマトグラムから得られる情報（たとえば化合物の構造情報など）が限られる。近年、質量分析法（MSD）を用いた手法が報告されて

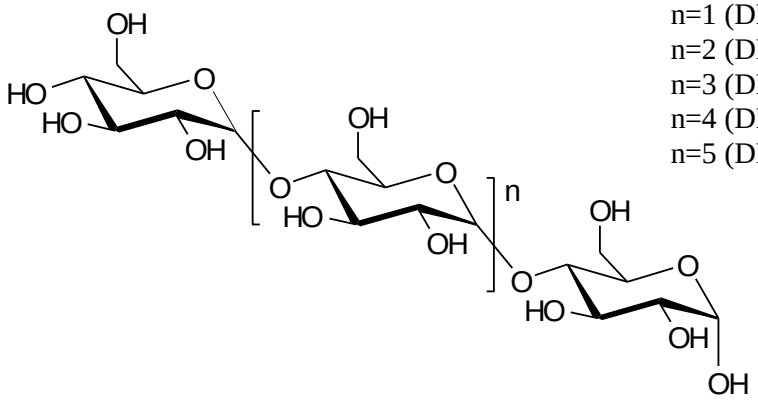
いる(Wang, J. *et al.*, 1999; Mauri, P. *et al.*, 2002; Liu, Y. *et al.*, 2005; Penna, N. *et al.*, 2009)。MSD は PAD と比較しいくつかの利点がある。たとえば、MSD では化合物の分子量や部分構造に関する情報が得られる。また、クロマトグラフィー上のピーク純度などの情報も得られる。さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法－飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF-MS）やフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計（FT-ICR-MS）を用いた分析法は、検体の精製を行うことなく、オリゴ糖の重合度や組成、濃度に関する情報を得ることが可能である(Kazmaier, T. *et al.*, 1998; Seipert, R. R. *et al.*, 2008)。ただし、オリゴ糖の場合、構成糖の組成が異なるだけで、分子量が同じであることが多いため、十分な分離なしに質量分析を行う場合は注意を要する。

本章では、グルコースおよびフルクトースから構成されるオリゴ糖に着目し、たばこ乾燥葉中での存在を確かめることを目的とした。まず、たばこ葉中のフルクトオリゴ糖およびマルトオリゴ糖を一斉分析できる分析法について述べる。また、乾燥葉ならびに葉たばこ中の両オリゴ糖組成、及び乾燥葉保存中のオリゴ糖の変動について種々検討した結果を示す。



Fructooligosaccharides (FOS)
(Inuline type)

n=0 (DP3): 1-Kestose
n=1 (DP4): Nistose
n=2 (DP5): Fructosylnistose



Maltooligosaccharides (MOS)

n=1 (DP3): Maltotriose
n=2 (DP4): Maltotetraose
n=3 (DP5): Maltopentaose
n=4 (DP6): Maltohexaose
n=5 (DP7): Maltoheptaose

図 3. 1　フルクトオリゴ糖とマルトオリゴ糖の構造式

3. 2　実験材料と方法

3. 2. 1　材料

試験検体として、葉たばこ、乾燥葉、たばこ製品を用いた。葉たばこは、日本たばこ産業株式会社 葉たばこ研究所（栃木県小山市）が運営する圃場で栽培されたものを収穫し、速やかに凍結乾燥した。以後、これを緑葉（Green leaf）と呼ぶ。乾燥葉は、バージニア種（米国産、ブラジル産）、バーレー種（米国産、ブラジル産）、オリエント種（ギリシャ産、トルコ産）を用いた。たばこ製品（cut filler）は日本市場に流通している紙巻たばこ 2 銘柄を購入し、原料刻を取り出して用いた。原料の水分含量は、第 2 章 2. 2. 5 水分測定の項と同様に行った。

マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースは林原生化学研究所（現：株式会社林原）から購入した。スクロース、D-フルクトース、D-グルコース、1-ケストース、ニストース、フルクトシルニストース、酢酸アンモニウム、およびアセトニトリル（LC/MS グレード）は和光純薬工業から購入したものを用いた。検体調製、標準溶液の作製、HPLC 移動相の調製にあたっては、すべて比抵抗値 18.2 MΩ·cm 以上の MilliQ（Millipore Co.）を用いた。

3. 2. 2　乾燥葉の保存試験

保存試験に供する乾燥葉は、あらかじめ 22°C 、60%RH 環境下で 48 時間調湿した。調湿後、密閉したポリプロピレン製容器内で、7°C, 22°C, 30°C, 40°C の 4 水準で 12 週間保存した。

3. 2. 3　分析検体の調製法

乾燥葉、または凍結乾燥した緑葉を約 20 g 取り、粉砕機（MiniBlender, Melitta

Japan Ltd., 東京）を用いて 1– 2 mm メッシュに粉砕した。1.000±0.001 g の粉末たばこを 50 mL バイアルに秤量し、40 mL の 50%アセトニトリルを加えて 30 分間の振盪抽出（200 rpm）を行い、超音波処理を室温以下にて 30 分間実施した。検体溶液を 5 分程度静置して上澄み部をデカンテーションし、遠心式限外濾過チューブ（10 kDa, Amicon Ultra 15 mL×2）を用いて濾過した。濾液を 20 mL 採取し、エバポレーターを用いて溶液量が 5 mL 程度になるまで減圧濃縮した。濃縮物を、MilliQ を用いて 10 mL までメスアップし、0.2 μm 孔径の PVDF メンブレンを用いて不溶物を濾過した。この濾液をオリゴ糖分析用の検体として用いた。

単糖およびニ糖の分析には、限外濾過操作後の濾液をそのまま検体として用いた。単糖およびニ糖は HPLC-RID によって分析した。機器分析の条件は、第 2 章 2. 2. 4 糖分析法の項と同様に行った。

オリゴ糖分析検体をプロダクトイオンクロマトグラフィー（Product ion chromatography: PIC）に供する場合は、検体溶液をさらに精製した。限外濾過操作後の濾液を、減圧濃縮によって 1 mL 程度にまで濃縮し、固層抽出カラム（Oasis MCX Cartridge (6 cm^3/150 mg, Waters Co.)に通液した。通過液を集め、2 mL にメスアップし、0.2 μm 孔径の PVDF メンブレンを用いて不溶物を濾過した。この検体溶液をプロダクトイオンクロマトグラフィーに供した。

3. 2. 4　分析条件

オリゴ糖分析における機器条件は以下の通りである。

Instrument

Agilent 1200 HPLC, 6410 triple-quadrupole MSD (Agilent Technology)

HPLC conditions

・Column: Develosil RP Aqueous Column（150×1.5 mm I.D., Nomura Chemical Co., Ltd.）

・Gradient elution: Mobile phase A（5 mM ammonium acetate）, Mobile phase B（Acetonitrile）; A100%(0-15 min) → A85%(15-30 min, linear gradient) → A85%(30-40 min) → A0%(20 min: post run)

・Flow rate: 0.1 mL/min

・Column temperature: 30°C

・Injection volume: 5 μL

Electrospray ionization conditions

・Negative ion mode

・Capillary voltage: 4000 V

・Drying gas temperature: 350°C

・Gas flow: 11 L/min

・Nebulizer pressure: 35 psi

多重反応モニタリング（Multiple reaction monitoring: MRM）におけるタンデム質量分析計（MS/MS）の各種条件および各成分の保持時間を表 3. 1 にまとめた。

プロダクトイオンクロマトグラフィー（Product ion chromatography: PIC）を行う場合は、MRM を行う際の機器条件を基本としたが、下記については適宜変更して実施した。

・Injection volume: 2-10 μL

・Collision energy: 5-35 V

・Scan time: 500-1000 ms

表3. 1　各化合物の保持時間とMS/MSのパラメーター

Compound	DP[a]	Fragmentor (V)	Precursor Ion (m/z)	CE[b] (V)	Product Ion (m/z)	Dwell Time (ms)	RT[c] (min)
FOS	3	140	503	20	323	50	5.6
FOS	4	160	665	25	485	100	13.2
FOS	5	160	827	30	647	200	31 ± 0.3
MOS	4	140	665	10	161	200	4.8-6.2
MOS	5	140	827	10	665	200	7.0-8.6
MOS	6	140	989	10	827	200	9.5-11.1
MOS	7	140	989	10	827	200	12.0-13.6

[a]DP = degree of polymerization, [b]CE = collision energy, [c]RT = retention time.

3. 3　オリゴ糖分析法の確立

3. 3. 1　分析法の選択理由と分析前処理法

たばこ葉には、褐変色素をはじめとする様々な高極性化合物が存在する。そのため、たばこ葉、特に乾燥葉中オリゴ糖の分析には、効率的な検体の前処理、成分の分離、そして選択性の高い検出が求められた。質量分析器（MSD）は成分選択性の高い検出器であるが、同じ分子量を持つ異性体が多いオリゴ糖の分析に用いるにはいくつか問題があった。そこで著者はまず、オリゴ糖の選択的な抽出・精製法を検討した。併せて、複数種のオリゴ糖が共存していても成分を個別に検出する方法を検討した。すなわち、クロマトグラフィーによるオリゴ糖同士の分離、および、タンデム型質量分析器によるイオン精製を検討した。

分析法の選択理由と、検体調製において留意した点を述べる。乾燥葉中のオリゴ糖を水抽出すると、夾雑物との分離が困難なだけでなく、抽出中にオリゴ糖が部分的に消失した。これは、第 4 章で詳細に述べる酵素作用による分解と推測された。したがって、乾燥葉中オリゴ糖の抽出は、酵素作用による基質分解を避けるために、アセトニトリルと水の混液によって行った。ただし、アセトニトリルとの混液中でも、中高温で長時間放置するとオリゴ糖は減少した。そこで、抽出操作時は温度上昇に注意し、また、抽出後は高分子を完全に除去するために限外濾過を行う必要があった。限外濾過後、後述する理由によりアセトニトリルを完全に留去した。

アミノ基を担持した親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、糖質分離に有効な汎用手法であるが、オリゴ糖分析においては問題が残存した。具体的には、分離に際しクロマトグラフィー移動相の極性を上げる必要があったが、アミノ系カラムは移動相の極性増加に伴って担体が一部溶出し、質量分析器による検出を妨害した。そこで今回、オリゴ糖の分離に C30 カラムを用いた。C30

カラムは水 100%の移動相を用いる事が可能であり、また、乾燥葉中のオリゴ糖を効率的に分離することができた。分離機構は C30 カラムの残存シラノールによるものと思われる。この時、検体溶媒として少量でもアセトニトリルが残っていると、保持時間が著しく変動するため、限外濾過後にアセトニトリルは完全に減圧留去する必要があった。

タンデム型質量分析計（MS/MS）は、単一のイオンからのフラグメンテーションを読み取ることができるため、通常の質量分析計以上の高い成分選択性を有する。また、フラグメンテーション解析によって得られる情報によって、成分同定がより容易となる。そこで、乾燥葉中のオリゴ糖の同定に MS/MS を用いることにした。以降、乾燥葉中オリゴ糖の同定までの検討結果、ならびに、種々のたばこ葉中のオリゴ糖含量の定量結果について述べる。

3. 3. 2　LC-ESI-MS/MS によるオリゴ糖のイオン化と分離

質量分析器を用いるオリゴ糖の分析に先立ち、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）によるオリゴ糖のイオン化について検討した。各種オリゴ糖の標準液、ならびに、乾燥葉から調製した検体にオリゴ糖をスパイクした溶液を用いて、イオン化条件を検討した。検体中のフルクトオリゴ糖とマルトオリゴ糖はネガティブイオンモードで効率よく検出できた。非誘導体化オリゴ糖は、アルカリ金属のアダクトイオンの形成を通して、ポジティブイオンモードで効率的にイオン化することが知られている(Bahr, U. *et al.*, 1997; Liu, Y. *et al.*, 2005; Penna, N. *et al.*, 2009)。しかし、たばこ乾燥葉の分析においては、ネガティブイオンモードでの S/N 比がより良好であり、再現性が高い結果となった。イオン化条件を調整することにより、フルクトオリゴ糖、マルトオリゴ糖とも、概ね脱プロトンイオン$[M-H]^-$を得ることができ、これを前駆体イオンとした。ただし、マルトト

リオース（MOS DP3）はイオン化されるものの、たばこ検体溶液中での再現性が乏しかった。マルトヘプタオース（MOS DP7）はイオン化と同時にフラグメンテーションが生じ、m/z 989 が収率良く得られたので、これを前駆体イオンとして扱った。

続いて、ピーク純度の向上および同一分子量のオリゴ糖を区別するため、MS/MS によるフラグメンテーションの条件検討を行った。フルクトオリゴ糖とマルトオリゴ糖は、それぞれのフラグメンテーションに一定の規則性を示した。図 3. 2 は、各種オリゴ糖の MS スペクトルを示している。マルトオリゴ糖は共通して 162 amu の質量損失を示した。この質量損失はグリコシド結合の開裂を意味するものと考えられる。この挙動は先行文献にある、ネガティブイオンの高速原子衝撃イオン化法（FAB）による開裂パターンと一致している(Garozzo, D. *et al.*, 1990)。一方、フルクトオリゴ糖はマルトオリゴ糖とは異なる挙動を見せた。すなわち、各重合度のフルクトオリゴ糖は共通して 180 amu の質量損失を示した。Collision Energy を 5– 30 V で推移させても、他のグリコシド結合型オリゴ糖で発生するような 18, 30, 60, 90 amu は観測されなかった(Garozzo, D. *et al.*, 1990; Bahr, U. *et al*., 1997)。一方、180 amu の損失と同時に、微量ながら 162 amu の損失が検出されたことから、180 amu の質量損失は、グリコシド結合の開裂と同時に起こる脱水反応によって生じていると考えられる。以上の結果から、フルクトオリゴ糖とマルトオリゴ糖は、重合度を同じとする分子（すなわち、分子量が同じと同義）でもフラグメンテーションパターンの違いによって区別することができた。また、高速液体クロマトグラフィーによっても成分分離を補助していることから、各化合物（MOS DP4-7, FOS DP3-5）を個別に検出可能となった。定量分析の際は、前駆体イオンから目的のプロダクトイオンを最も収率良く生成させるように、Collision Energy の電圧を決定した（表 3. 1 参照）。

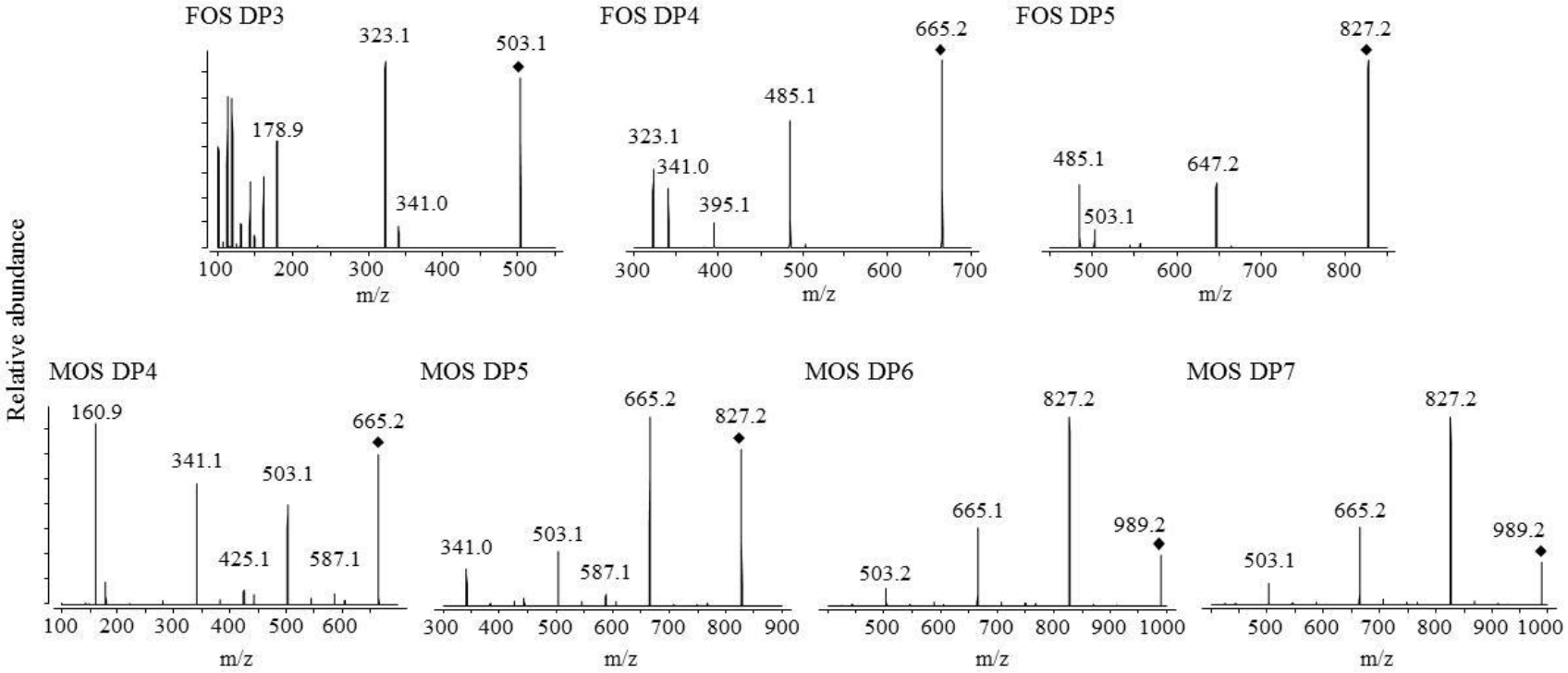


図3. 2　ESI-MS/MS(Negative-ion mode)によるオリゴ糖標品のMSスペクトル
オリゴ糖標品:フルクトオリゴ糖(FOS), マルトオリゴ糖(MOS)
DP: Degree of polymerization (重合度), ◆:前駆体イオン

3. 4　たばこ葉中のオリゴ糖の検出・同定

図 3. 3 は検体の MRM クロマトグラムである。ここでは標品をスパイクしたときのピーク強度の増加を持って、各オリゴ糖を帰属した。

3. 5　たばこ葉中のオリゴ糖の定量分析

種々のたばこ葉に関して、そのオリゴ糖組成の違いを確認するために定量分析を実施した。3. 3 で報告したオリゴ糖分析法は、標品を用いた場合の検量線は直線であった。しかし、たばこ乾燥葉の検体溶液に対するスパイク試験を行ったところ、一部のオリゴ糖、特に保持時間が短い FOS DP3 や MOS DP4 に関しては、スパイクした量に対応するだけのシグナル強度の増加が観測されないことがあった。一方で、検体に対する添加量とシグナル強度の増加量は比例関係にあった（図 3. 4)。そこで、検体溶液中のオリゴ糖について、絶対検量線法ではなく標準添加法を用いて定量した。乾燥葉からのオリゴ糖の抽出率、抽出中に分解等が起きていないことを確認するため、添加回収試験を実施した。全てのオリゴ糖の添加回収率は 80– 120%の範囲にあった。最終的な検体溶液中のオリゴ糖濃度は、1-ケストース（FOS DP3）で 1.0-50 μg/mL、その他のオリゴ糖で 0.05-5.0μg/mL であった。乾燥葉中のオリゴ糖の定量は繰り返し 3 回行った。

緑葉、乾燥葉、製品たばこについて、オリゴ糖含有量を定量した結果を表 3. 2 に示した。オリゴ糖の組成および含有量は、品種、原産地によって異なることが分かった。バーレー葉からはいずれのオリゴ糖も検出されなかった。緒言 1. 2 で述べたように、バーレー葉は Air-curing を経て乾燥される。バーレー葉は通常、単糖、ニ糖は Curing の過程で完全に消費される。オリゴ糖も同様に消費されたものと考えられた(Leffingwell, J. C., 1999)。一方で、緑葉には含有されないフルクトオリゴ糖が、バージニア葉やオリエント葉に含まれていることは興味深い。

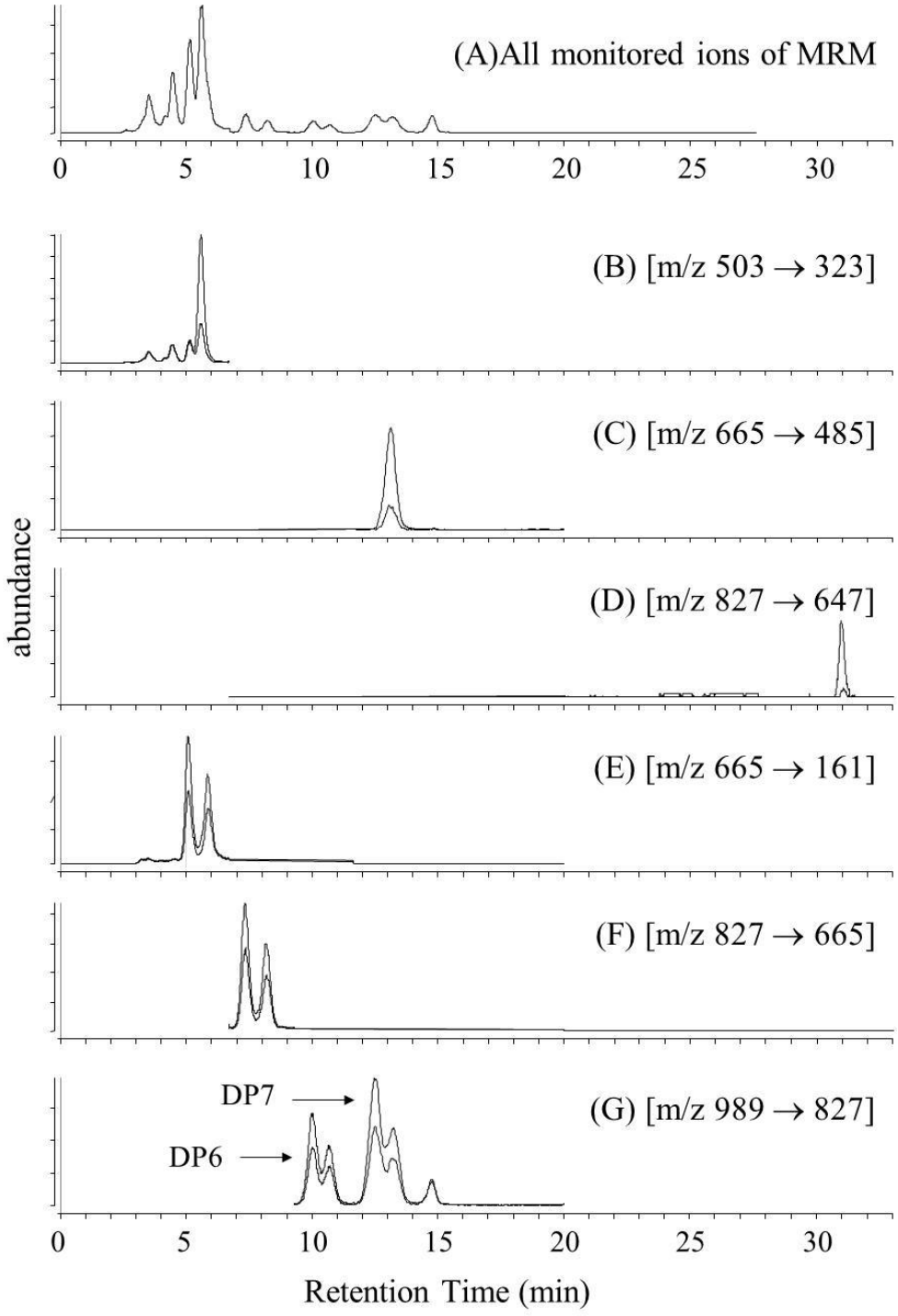


図 3. 3　多重反応モニタリングクロマトグラム

検体溶液（乾燥葉抽出物）と検体に標品をスパイクした溶液のクロマトグラムを重ね書き，　(A) 全観測イオン, (B) FOS DP3, (C) FOS FP4, (D) FOS DP5, (E) MOS DP4, (F) MOS DP5, (G) MOS DP6, DP7.

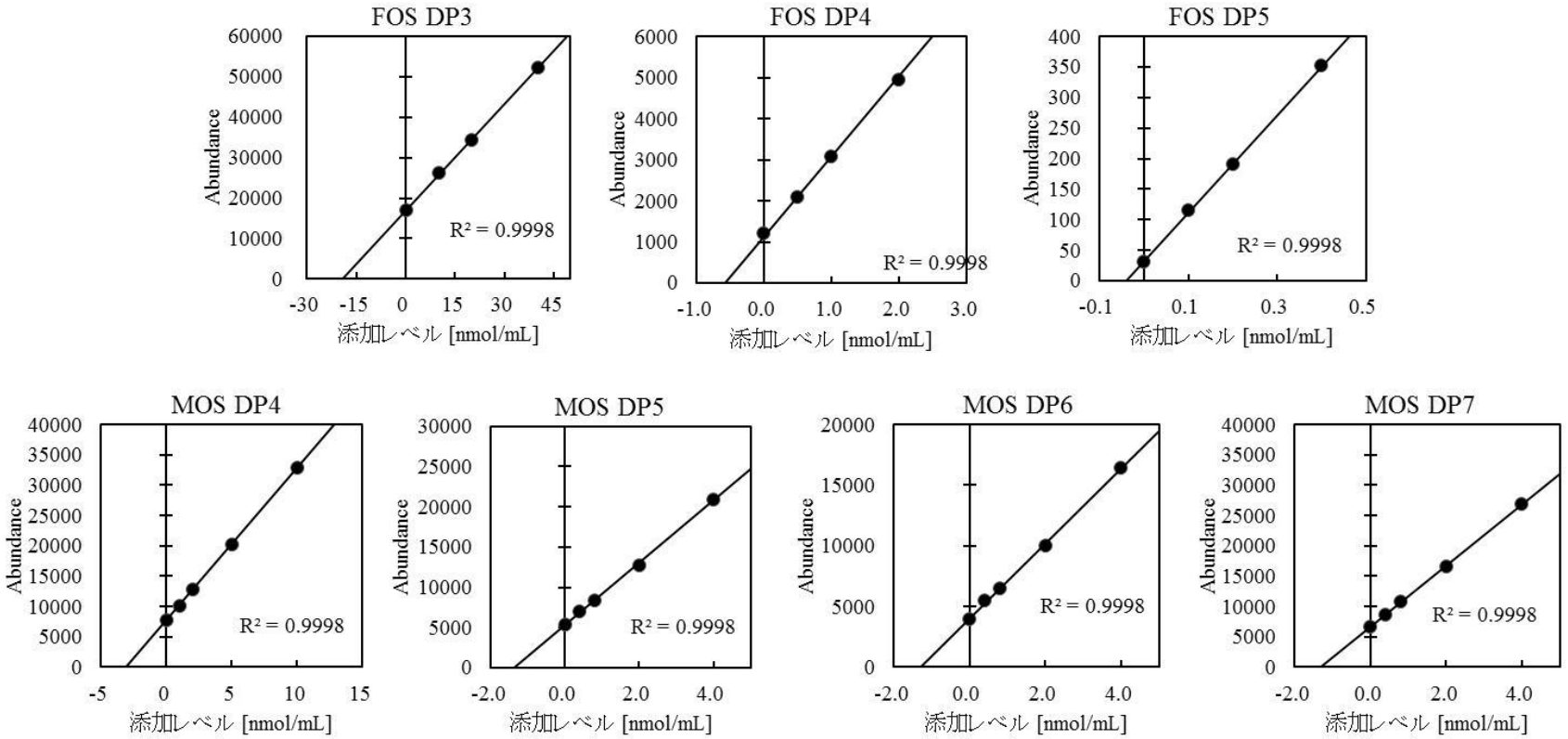


図3. 4　分析検体への標品添加に伴うシグナル強度（Abundance）の増加
分析検体：オリエント葉（トルコ産葉）

表3.2　種々のたばこ葉中のオリゴ糖定量値

Compound/DP[a]	Leaf type	Flue-Cured Virginia		Burley	Orient		Green leaf		Cut filler[d]	
	growing districts	USA	Brazil	USA, Brazil	Greece	Turkey	Japan	Japan	Sample A,	Sample B
FOS DP3	Average (ppm)[b,c]	31.45	41.31	N.D.	51.55	224.4	N.D.	N.D.	283.3	70.89
	SD (ppm)	±0.96	±2.84		±3.47	±5.15			±16.57	±3.52
	RSD (%)	3.0	6.9		6.7	2.3			5.8	5.0
FOS DP4	Average (ppm)	trace	trace	N.D.	2.16	10.00	N.D.	N.D.	19.09	2.77
	SD (ppm)				±0.07	±0.63			±0.58	±0.29
	RSD (%)				3.3	6.3			3.0	10.3
FOS DP5	Average (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	trace	1.18	N.D.	N.D.	4.97	trace
	SD (ppm)					±0.14			±0.27	
	RSD (%)					11.7			5.5	
MOS DP4	Average (ppm)	4.63	6.74	N.D.	7.41	46.62	11.79	1.84	72.21	10.23
	SD (ppm)	±0.64	±0.78		±0.09	±1.43	±1.01	±0.10	±3.38	±0.16
	RSD (%)	13.7	11.6		1.2	3.1	8.6	5.3	4.7	1.5
MOS DP5	Average (ppm)	2.46	3.75	N.D.	3.08	26.12	12.66	1.73	53.58	5.34
	SD (ppm)	±0.04	±0.23		±0.35	±0.46	±0.82	±0.16	±3.15	±0.41
	RSD (%)	1.8	6.1		11.4	1.8	6.5	9.2	5.9	7.7
MOS DP6	Average (ppm)	6.11	8.07	N.D.	3.36	31.83	29.8	3.64	58.55	10.44
	SD (ppm)	±0.58	±0.21		±0.17	±3.22	±1.52	±0.32	±4.27	±0.19
	RSD (%)	9.5	2.5		5.1	10.1	5.1	8.9	7.3	1.8
MOS DP7	Average (ppm)	7.89	7.04	N.D.	4.63	37.11	31.24	5.58	45.55	8.51
	SD (ppm)	±0.38	±0.24		±0.14	±3.57	±0.87	±0.33	±0.96	±0.56
	RSD (%)	4.8	3.4		3.0	9.6	2.8	5.9	2.1	6.6

[a] Degree of polymerization. [b] Amounts of analytes in extract were converted to the amounts in tobacco leaves. Average (ppm) was evaluated at dry weight base (method described in material and method). [c] Analysis including preparation of tobacco extract were repeated 3 times. [d] Cut filler of the product were taken out from commercially cigarettes. Sample A and B were purchased at Japanese market.

タバコはノンフルクタン型植物に分類される。また、葉たばこ中にフルクトオリゴ糖が存在しないことを報告する先行文献が存在するため(Pilon-Smits, E. A. H. *et al.*, 1995; Sprenger, N. *et al.*, 1997)、緑葉にフルクトオリゴ糖が含有されないことはあらかじめ予想できた。ここで著者は、乾燥葉中のフルクトオリゴ糖は葉たばこ収穫後の Curing 中もしくは乾燥葉保存中に生成したと考えた。

3. 6　乾燥葉保存中のオリゴ糖含量変化

3. 2. 2 に記述した方法で乾燥葉の保存試験を実施し、保存中のオリゴ糖組成の変化を調べた。図 3. 5 に、保存試験前後のオリゴ糖含有量を示す。マルトオリゴ糖は、温暖な環境下で保存することにより減少した（図 3. 5 (B)）。マルトオリゴ糖は、グルコースやマルトースなどと同様、還元性末端を有する。そのため、乾燥葉保存中に、アミノカルボニル反応に代表されるような種々の化学反応によって減少することは十分に考えられる(Friedmann, M., 1996)。一方、フルクトオリゴ糖は保存環境中温度に依存する形で増加した（図 3. 5 (A)）。フルクトオリゴ糖は、貯蔵多糖の加水分解による生成ではないと考えられる。理由は上述した通り、タバコがノンフルクタン型植物であることによる。また、40°C 程度の温和な環境下で、化学的な反応による糖質の縮合が生じたとは考えにくい。なお、フルクトオリゴ糖は、どの乾燥葉原料の保存試験でも増加するわけではなく、保存前後で含有量が変化しない検体もあった。

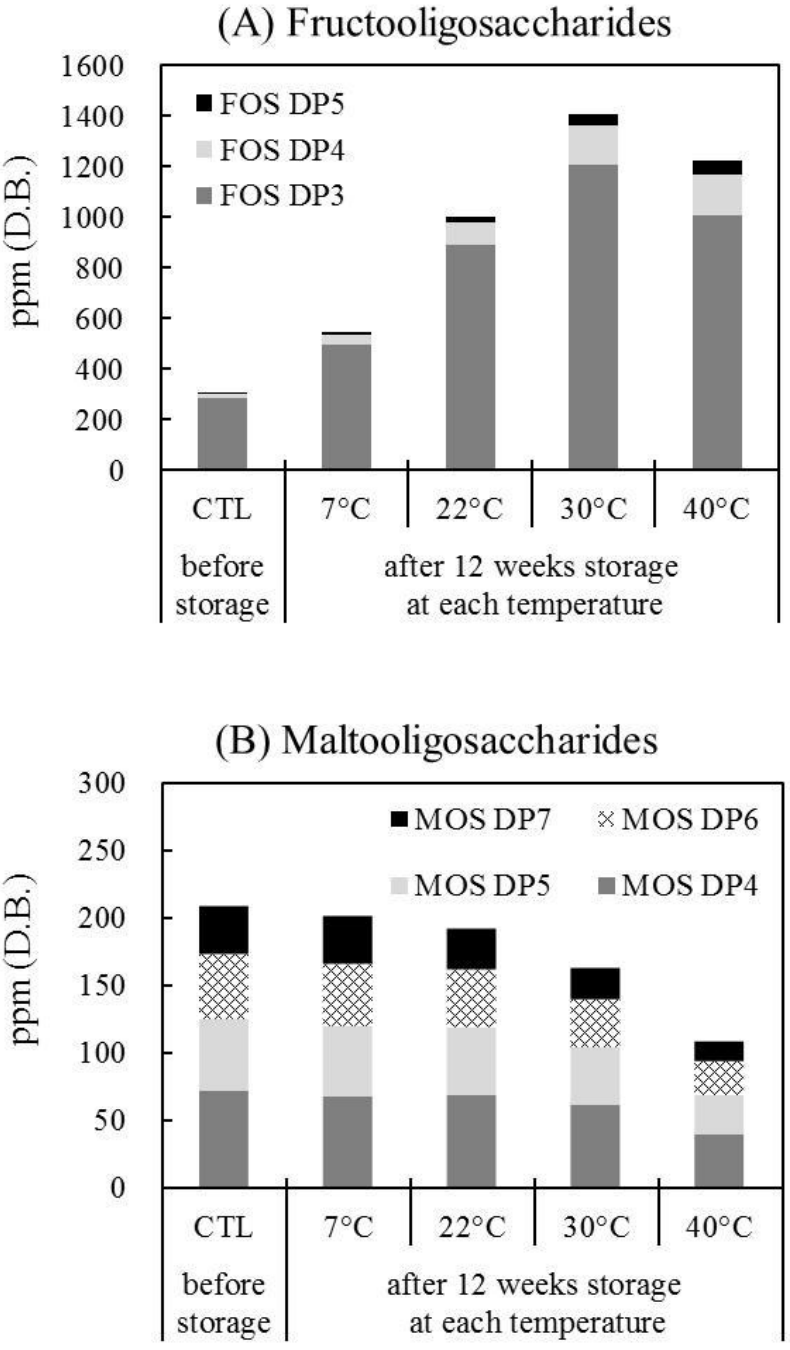


図 3. 5　乾燥葉（製品原料）の保存中オリゴ糖含有量変化

（A）フルクトオリゴ糖,（B）マルトオリゴ糖

3. 7　乾燥葉保存中に生じるフルクトオリゴ糖生成現象

乾燥葉保存中にフルクトオリゴ糖が増加した。本現象は、スクロースを基質とする酵素反応によって生じたという仮説を立てた。仮説検証のためのモデル実験として、まず以下に記す 3 つの Sample を作製した。

Sample 1) バーレー葉（糖質を殆ど含まない：水溶性糖含量 1wt%未満）

Sample 2) スクロースを添加したバーレー葉（約 5wt%添加）

Sample 3) Sample 2 と同様にスクロースを添加するが、スクロース添加前に 120°C, 10 分間加熱したバーレー葉

Sample 2, 3 のスクロース添加は、スクロース水溶液を噴霧する方法で行い、この時できるだけ均一に添加した。スクロース添加後は、熱負荷がかからないように冷風で速やかに乾燥した。スクロース添着量は、乾物重量当で 5– 6wt%になるようにした。Sample 3 のスクロース添加前の加熱処理は、オートクレーブを用いて 120°C, 10 分間行った。スクロース添加後、22°C, 60%RH 雰囲気下、24 時間調和した。3 つの乾燥葉は 40°C で一斉に保存し、定期的に一部採取して内容成分の分析を行った。

図 3. 6 は保存開始から 4 週間経過した Sample 1, 2 の分析結果を示している。まず、それぞれの Sample から調製した試料溶液を PIC に供した。スクロースを添加していないバーレー葉はフルクトオリゴ糖を生成しなかったが、スクロースを添加したバーレー葉に関しては PIC 上でいくつかのピークが観測された。各ピークの MS スペクトルを確認したところ、オリゴ糖標品の MS スペクトルと一致した（図 3. 2 参照）。また、オリゴ糖標品とクロマトグラフィーの溶出時間が一致した。以上のことから、PIC 上のピークシグナルはフルクトオリゴ糖に帰属され、スクロースを添加したバーレー葉が保存中にフルクトオリゴ糖を生成することが明らかとなった。

図 3. 7 は、Sample 2 と Sample 3 の保存中のフルクトース、グルコース、スクロースの含有量変化を示している。Sample 2 では、保存試験中に時間経過とともにスクロースが減少した。保存開始から 4 週間までの間、スクロースが減少する一方でフルクトースとグルコースが生成した（図 3. 7 (A)）。これは、第 2 章で論じた酵素的な加水分解が生じたと考えられる。一方、Sample 3 ではスクロースの減少や単糖類の生成は見られなかった（図 3. 7 (B)）。Sample 3 は、試料調製の過程で加熱操作を施している。そのため、加水分解反応に寄与する酵素が失活し、糖類の組成変化が生じなかったと考えることができる。図 3. 8 は同じく Sample 2 と Sample 3 の保存中のフルクトオリゴ糖の含有量変化を示している。Sample 2 では、時間経過とともにフルクトオリゴ糖が生成した（図 3. 8（A））。生成するフルクトオリゴ糖は重合度ごとに差異があり、重合度が低い 1-ケストース（DP3）の生成量が最も多く、次いでニストース（DP4）が多く、フルクトシルニストース（DP5）はごくわずかに生成した。また、1-ケストースは保存試験開始から 2 週までは増加したが、4 週以降は減少に転じた。Sample 2 は保存試験開始直後から 1-ケストースが含有されているが、これは試料調製中に一部すでに生成反応が生じたものと思われる。Sample 2 の保存中にフルクトオリゴ糖の組成が著しく変動する一方で、Sample 3 ではフルクトオリゴ糖の生成挙動は見られなかった図 3. 8（B）。これは、図 3. 7（B）で単糖類が生成しなかった事と同様に考察できる。すなわち加熱処理による酵素作用の不活化に起因すると想定される。

以上の結果から、乾燥葉の保存中に生じるフルクトオリゴ糖の生成は、スクロースを基質とする酵素反応によるものであることが強く示唆された。

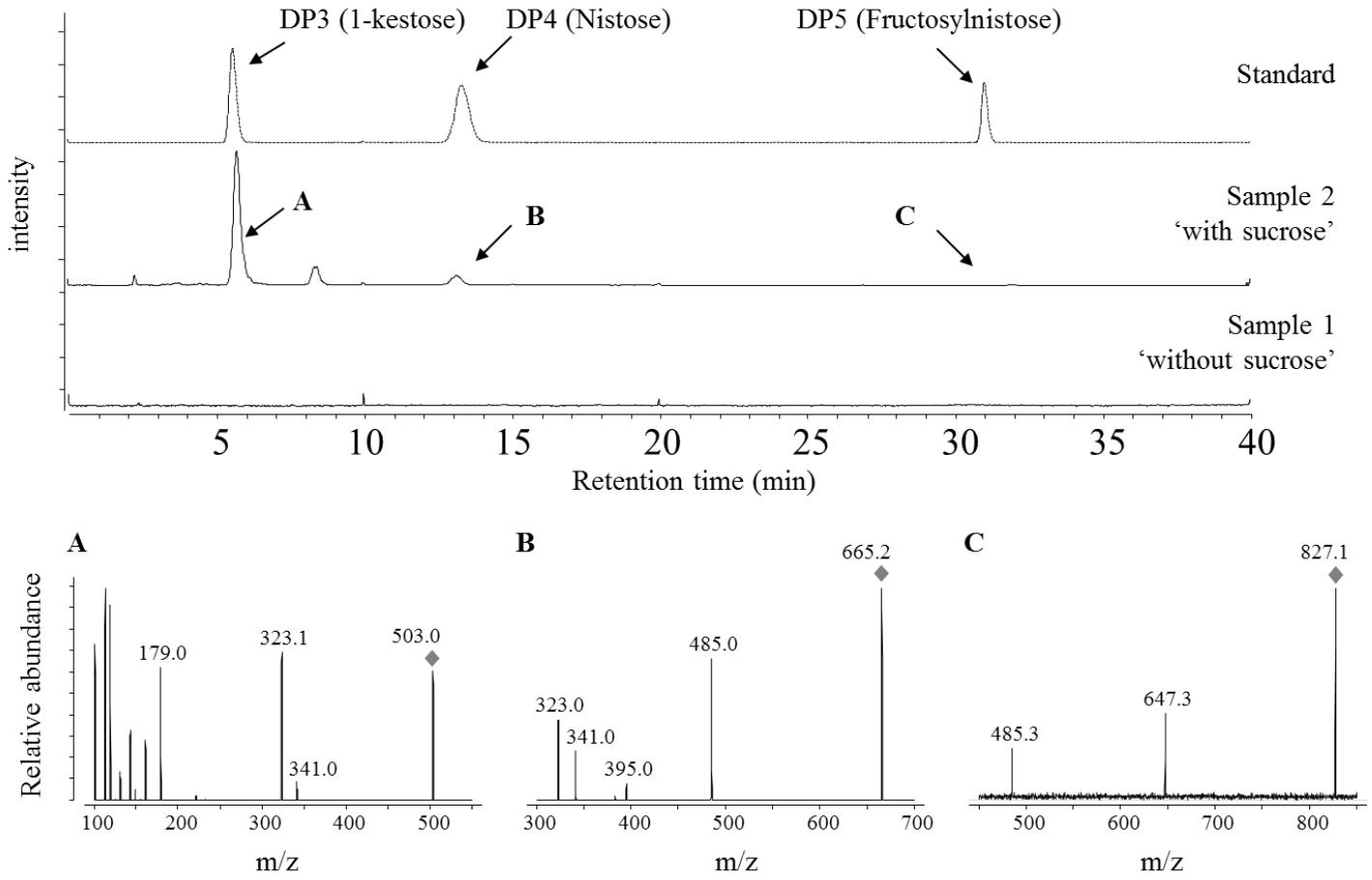


図3. 6　プロダクトイオンクロマトグラフィー（PIC）とMSスペクトル
Standard) オリゴ糖標品
Sample 1) 通常のバーレー乾燥葉を40˚Cで4週間保存したサンプル
Sample 2) スクロースを添加したバーレー葉を40˚Cで4週間保存したサンプル
PIC上のA, B, Cは、同じアルファベットのMSスペクトル（A, B, C）に対応する。

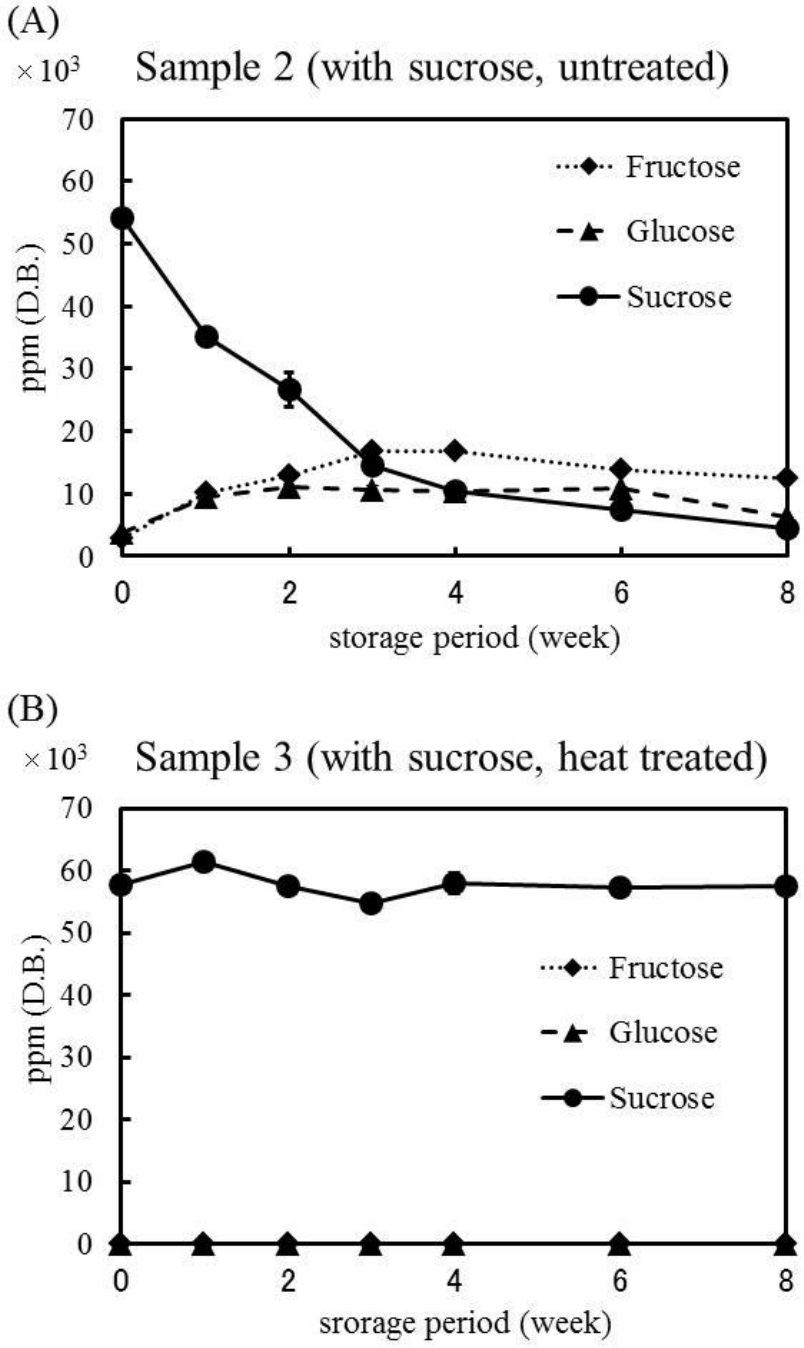


図 3. 7　スクロースを添加したバーレー葉保存中の糖質の経時変化

（その１：フルクトース、グルコース、スクロースの含量変化）

(A) Sample 2: スクロースを添加したバーレー葉

(B) Sample 3: 加熱処理後にスクロースを添加したバーレー葉

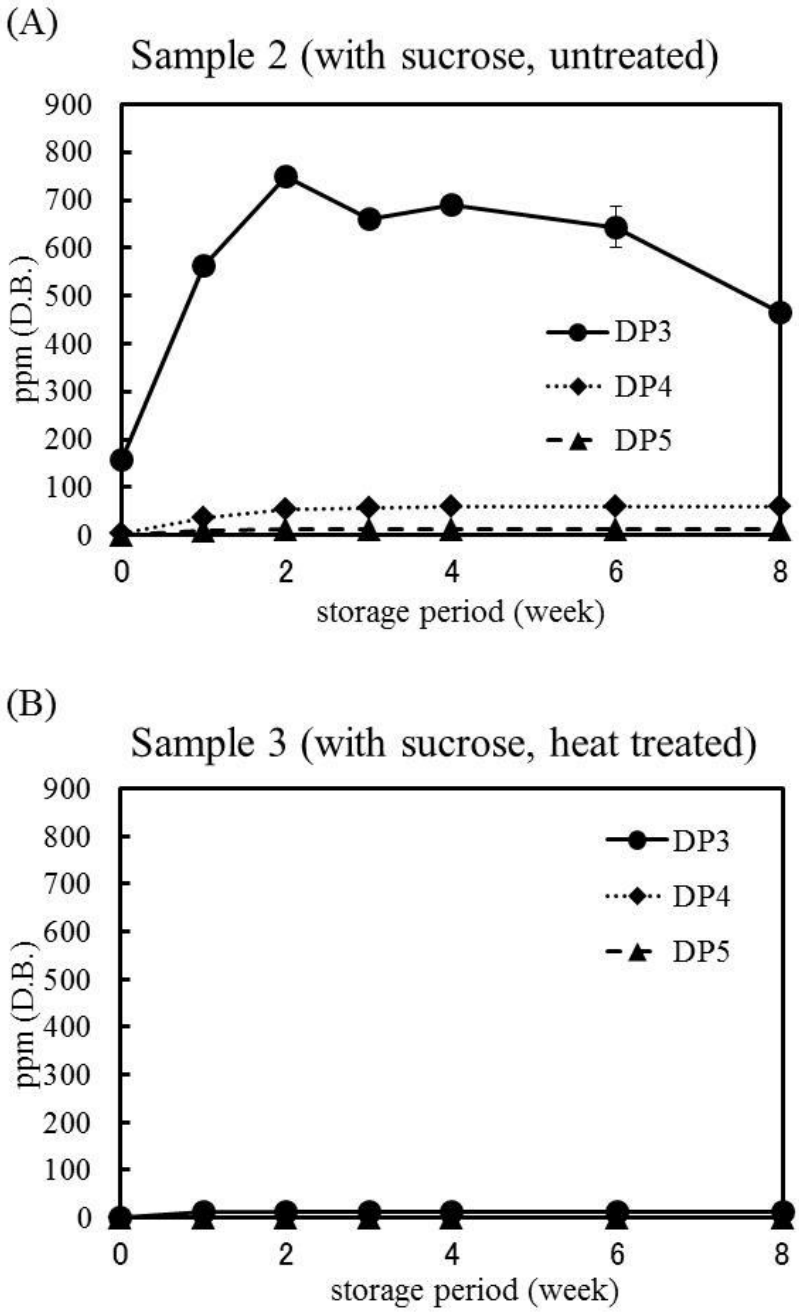


図 3. 8　スクロースを添加したバーレー葉保存中の糖質の経時変化

（その２：重合度(DP)3– 5 のフルクトオリゴ糖の含量変化）

(A) Sample 2: スクロースを添加したバーレー葉

(B) Sample 3: 加熱処理後にスクロースを添加したバーレー葉

3. 8　まとめと考察

本章において、著者は、種々のたばこ葉中のオリゴ糖組成について研究した結果を述べた。まず、LC-ESI-MS/MS を用いたたばこ乾燥葉中のオリゴ糖分析法について述べた。今回確立した分析法を用いて、種々のたばこ葉からマルトオリゴ糖およびフルクトオリゴ糖を同定し、これらを定量した。続いて、乾燥葉中のオリゴ糖の変動を確認し、その変動理由の一部を明らかにした。中でも、フルクトオリゴ糖が乾燥葉保存中に生成することに注目した。検討の結果、本現象はスクロースを基質とする酵素的な反応であることが示された。

スクロースからフルクトオリゴ糖が生成するメカニズムについて考察する。本反応はフルクトース転移反応であると考えられる。スクロースのフルクトシル残基をもう一分子のスクロースへと転移させる酵素に、Sucrose:sucrose fructosyltransferase (1-SST: EC 3.2.1.99)がある(Henry, R. J., and Darbyshire, B., 1980; Pranznik, W. *et al.*, 1990)。また、スクロースのフルクトシル残基をフルクトオリゴ糖に転移させる酵素に Sucrose:fructan fructosyltransferase（SFT）、フルクタンからフルクタンにフルクトシル残基を転移させる酵素に、Fructan:fructan fructosyltransferase (FFT: EC 2.4.1.100)がある(Sprenger, N. *et al.*, 1995; Vergauwen, R. *et al.*, 2003)。これらの酵素はフルクタン合成のための重要な酵素群である(Henry, R. J., and Darbyshire, B., 1980; Shiomi, N., 2008)。本章では乾燥葉保存中に、スクロースから 1-ケストースが生成した。この反応は見かけ上 Sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)の働きにあたる。量的に少ないがニストースやフルクトシルニストースが増加したことから、SFT や FFT にあたる反応も同時に観測された。

SST はフルクタン合成の初期反応を担う重要な酵素である。本酵素はキク科やユリ科またはイネ科の植物から発見されるが、タバコ植物（ナス科、タバコ

属）には含まれない(Pranznik, W. *et al.*, 1990; Lüscher, M. *et al.*, 2000; Ghazi, I. *et al.*, 2007)。しかし、少なくともタバコはスクロースの加水分解酵素を有する。さらに、乾燥葉中にこれらの酵素活性が残存していることも、本章の検討から明らかである。スクロースを加水分解する主要な酵素として、インベルターゼ（Invertase, β-D-fructofuranosidase: EC 3.2.1.26）とスクラーゼがある(Sucrase, sucrose-α-D-glucohydrolase: EC 3. 2. 1. 48)。インベルターゼはスクロースのフルクトシル骨格を認識し、スクラーゼはグルコース骨格を認識して加水分解することが知られている。インベルターゼは、認識したフルクトシル残基を、一部スクロースに転移させる能力があることが、他植物の研究報告にある(Cairns, A. J., and Ashton, J. E., 1991; Ende, W. V. D., and Laere, A. V., 1993; Obenland, D. M. *et al.*, 1993; Agopian, R. G. D. *et al.*, 2009)。本章で述べた乾燥葉保存中のフルクトオリゴ糖の生成は、インベルターゼの副反応によって生じた可能性が考えられた。

本論文の第 4 章では、乾燥葉中でスクロースの加水分解に寄与した酵素を精製し、その性質について調べた結果を報告する。

第 4 章

たばこ乾燥葉中で活性を示すインベルターゼの精製

4. 1　序

第 3 章において、たばこ乾燥葉中からフルクトオリゴ糖を同定したことを報告した。また、フルクトオリゴ糖は、乾燥葉保存中にスクロースを基質とする酵素反応によって生成することを示した。一方、タバコはノンフルクタン型植物に分類されることから、SST に代表されるようなフルクトース転移酵素を持たないと考えられていた。前章ではこれらの事実を踏まえ、たばこ乾燥葉保存中にけるフルクトオリゴ糖の生成は、一部の植物で報告されているようなインベルターゼの副反応によるものと推測した。

インベルターゼ (β-D-fructofuranosidase: E.C. 3.2.1.26) は、一般にはスクロースをグルコースとフルクトースに加水分解する酵素の一つとして知られる。製菓の原料によく用いられる転化糖（Invert sugar）は、スクロースを酸もしくはインベルターゼによって加水分解したものである。‘Invert’の名は、スクロースを加水分解すると、偏光に対する旋光面が逆転（Invert）することに由来する。インベルターゼは、基質のフルクトフラノシル残基を認識してグリコシド結合を加水分解する酵素であり、ラフィノースやスタキオースなどのフルクトフラノシル残基を有する基質に対しても作用する。また、上述したように加水分解だけでなく糖転移能を有することが、他の植物種においていくつか報告されている。

インベルターゼは微生物、藻類、植物にと、幅広い生物種に存在しており、特に、高等植物には普遍的に存在する(Lee, H. S., and Sturm, A., 1996; Ishimoto, M., and Nakamura, A., 1997; Belcarz, A. *et al.*, 2002)。タバコに関して言えば、Nakamura らが培養細胞から酸性インベルターゼを単離し、その性質を報告している(Nakamura, M. *et al.*, 1988)。また、Greiner らは cDNA 上にコードされた細胞壁型インベルターゼについて報告している(Greiner, S. *et al.*, 1995)。植物中のインベルターゼに関して、これまでに非常に多くの研究報告がなされているが、植物の

生命活動が停止してなお残存するインベルターゼの影響については、これまでほとんど注意が向けられていない(Nakanishi, K., and Yokotsuka, K., 1990)。

葉たばこは収穫後、Curing, Threshing, Aging などの様々な工程を経る。しかし、これらの工程を経た後の乾燥葉でも、少なくともスクロースの加水分解活性を有することをこれまでの検討で示した。本章では、乾燥葉中で活性を示すスクロース加水分解酵素を精製し、その性質を調べた。特に、フルクトース転移反応について着目し、第 3 章で述べた乾燥葉中のフルクトオリゴ糖生成反応との関係について検討した。

4. 2　実験材料と方法

4. 2. 1　材料

試験検体として、葉たばこおよび乾燥葉を用いた。葉たばこは、日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター（静岡県磐田市）で栽培されたものを収穫して用いた。乾燥葉は、2008 年ブラジル産バーレー種を使用した。乾燥葉は粉砕機（奈良機械製作所）を用いて 0.5– 1.0 mm のパウダーに粉砕した。原料の水分含量測定は、第 2 章 2. 2. 5 水分測定の項と同様に実施した。

4. 2. 2　乾燥葉からの酵素タンパク質の抽出

乾燥葉の粉末 1 kg に対し、0.1 % ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル（Triton-X100）を含む 4.8 mM クエン酸－10.2 mM リン酸水素二ナトリウム緩衝液（15 mM McIlvaine 緩衝液、pH 5.4、以後 Buffer A と表記）5 L を加えて、4°C 以下を保ちつつ攪拌抽出した。抽出後、二層の Miracloth (Merck Ltd.)を用いて固形物を濾過し、濾液を 4,800 ×g、30 分間で遠心分離を行って 3.5 L の褐色液を得た。ここで得られる褐色液を「Crude extract」と定義する。以後、断りがな

い限りすべての操作は 4°C 以下で実施した。

4. 2. 3　活性炭処理と限外濾過

Crude extract 約 3.5 L に対して 12 w/v%の活性炭（リン酸、硫酸洗浄グレード、Sigma-Aldrich Co.）を加え、5 分間激しく攪拌した。その後、処理液（活性炭との混合液、黒色）をセライト濾過した。セライトはあらかじめ Buffer A で数回洗浄しておいた。薄褐色の濾液を、0.45 μm 孔径のポリエーテルスルホン素材のメンブレン（NALGENE, Nalge Nunc International Co.）を用いて濾過した。均一な濾液を、限外濾過膜を用いて 50 mL まで濃縮した（30 kDa, Millipore Co.）。濃縮後、0.1% Triton-X を含む 20mM Bis-Tris 緩衝液（pH 6.0, 以後 Buffer B と表記）を 1 L 加えて希釈し、再び 50 mL まで濃縮した。Buffer B での希釈および濃縮操作をもう一度繰り返し、最終的に 50 mL の濃褐色液を得た。

4. 2. 4　イオン交換クロマトグラフィー

50 mL の濃褐色酵素液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。陰イオン交換担体は、あらかじめ Buffer B で平衡化しておいた Q sepharose fast flow (Column volume: 100 mL, GE Healthcare UK Ltd.) を用いた。カラム保持されたタンパク質は 300 mL の Buffer B で洗浄したのち、0.1% Triton X-100, 300 mM NaCl を含む pH 6.0, 20 mM Bis-Tris 緩衝液 200 mL を用いて、流速 5 mL/min で溶出した。次の精製ステップに備え、溶出液は遠心式限外濾過チューブ（30 kDa, Amicon Ultra）を用いて濾過し、Buffer C: 20 mM Bis-Tris, 500 mM NaCl, 1mM $MnCl_2$, 1mM $CaCl_2$, pH 6.0 に置換した。最終的に 50 mL の淡い褐色液を得た。

4. 2. 5　レクチン担体固定化クロマトグラフィー

4. 2. 4 で分画した淡い褐色液 50 mL は、レクチン担体固定化クロマトグラフィーに供した。担体は Concanavalin A Sepharose 4B Fast Flow Column（GE Healthcare UK Ltd.）の 5 mL カラムを 2 個連結して使用した。担体はあらかじめ Buffer C で平衡化しておいた。保持されたタンパク質は 50 mL の Buffer C で洗浄した後、500 mM NaCl, 1 M α-D-メチルグルコピラノシドを含む 20 mM Bis-Tris 溶液を 100 mL 用いて溶出した。すべてのクロマトグラフィー操作は 1 mL/min の溶出速度で実施した。次の精製ステップに備え、溶出液は遠心式限外濾過チューブ（30 kDa, Amicon Ultra）を用いて濾過し、Buffer D: 20 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl, pH 6.0 に置換した。最終的に 10 mL の淡い褐色溶液を得た。

4. 2. 6　ゲル濾過クロマトグラフィー

4. 2. 5 で得られた調製溶液は遠心式限外濾過チューブ（30 kDa, Amicon Ultra）を用いて 500 μL 以下まで濃縮した。濃縮した酵素液を、ゲル濾過クロマトグラフィーに供した。クロマトグラフィーは Ächta design FPLC, Frac-950 fraction collector (GE Healthcare UK Ltd.)を用いて行った。カラムはあらかじめ Buffer D で十分に平衡化した Superdex 200 HR16/60 gel filtration column (GE Healthcare UK Ltd.)を使用した。溶離液には Buffer D を用い、流速 0.5 mL/min で溶出した。カラム空隙容量はブルーデキストリンを用いて決定した（Void volume: 42 mL）。フラクションサイズは 2.0 mL または 5.0 mL とした。

4. 2. 7　葉たばこからの酵素液の調製とゲル濾過クロマトグラフィー

葉たばこ（*N. tabacum*）は収穫後、葉脈部を除去した。以降の作業はすべて 4°C 以下で行った。350 g の葉肉組織を 700 mL の Buffer A 中でホモジナイズした。

二層の Miracloth (Merck Ltd.)を用いてホモジネートを濾過した。濾液を冷却したアセトン中に少量ずつ攪拌しながら注いだ。この時の溶液温度は－30°C であった。アセトン混合溶液を 6,000 ×g で 15 分間遠心分離し、沈殿物を回収して減圧乾燥を行った。得られた乾燥固体をすり鉢で粉砕し、19 g の白色粉末を得た。このうち 4 g をバイアルに秤量し、80 mL の Buffer D を用いて酵素タンパク質を抽出した。抽出液を 4,800 ×g で 30 分間遠心分離した。上清 40 mL を取り出し、遠心式限外濾過チューブ（30 kDa, Amicon Ultra）を用いて濃縮した。濃縮液を 2 mL に Buffer D を用いてメスアップし、不溶物を 0.2 μm 孔径セルロースアセテートメンブレン（GE Healthcare UK Ltd.）を用いて濾過した。濾液 1.0 mL をゲル濾過クロマトグラフィーに供した。クロマトグラフィーの条件は 4. 2. 6 と同様に実施した。

4. 2. 8　酵素活性測定

pH 5.0, 50 mM の McIlvaine 緩衝液中、100 mM スクロースと酵素溶液を 50°C で 15 分間、ヒートブロックを用いてインキュベートした。反応は 1 M 炭酸ナトリウムを加えて停止した。反応停止後の溶液の pH は約 10 であった。フルクトース転移活性を測定する場合は、反応停止を氷冷による急速冷却によって行い、速やかに 4°C で限外濾過（30 kDa, Amicon Ultra micro-centrifugal tube）を行った。

インベルターゼ活性は、単位時間に遊離するグルコースを定量することによって決定した。基質特異性の評価の場合、たとえばラフィノースやスタキオースを基質とする場合、遊離するフルクトースの量を定量した。グルコースおよびフルクトースの定量には、F-kit Glucose(ヘキソキナーゼ法) もしくは F-kit Glucose/Fructose（ヘキソキナーゼ法およびアイソメラーゼを用いた複合メソッド）を用いた（Roche Applied Science, Switzerland）。フルクトース転移活性は、

単位時間当に遊離する 1-ケストースの定量によって決定した。1-ケストースの定量は、Agilent 1200 HPLC ならびに 6410 Triple Quadrupole MSD (LC/MS/MS, Agilent Technology)を使用して行った。精製酵素の諸性質を決定する試験、たとえば至適 pH や *Km* の測定を行う場合、対応する条件（温度、pH、基質濃度）を適宜変更した。また、金属イオンの影響を観測する試験においては、クエン酸による金属イオンのキレート効果を避け、酵素活性測定時に McIlvaine 緩衝液ではなく酢酸緩衝液を用いた。

4. 2. 9　フルクトオリゴ糖分析法

フルクトース転移能確認のためのプロダクトイオンクロマトグラフィー（PIC）、フルクトース転移活性測定（フルクトオリゴ糖定量）のための多重反応モニタリング（MRM）は、3. 2. 4 で述べたオリゴ糖分析法を簡便化した方法で行った。以下に LC、PIC、MRM の条件について表記した。なお、使用装置およびイオンソースの条件は 3. 2. 4 と同様である。

HPLC conditions

・Column: Develosil RP Aqueous Column（150×1.5 mm I.D., Nomura Chemical Co., Ltd.）

・Gradient elution: 5 mM ammonium acetate (isocratic elution)

・Flow rate: 0.1 mL/min

・Column temperature: 30°C

・Injection volume: 2 μL

PIC conditions

・Collision energy: 10 V

・Scan time: 500 ms

・Scan range: m/z 100−700

MRM conditions

RT[a] (min)	Fragmentor (V)	Precursor Ion (m/z)	CE[b] (V)	Product Ion (m/z)	Dwell Time (ms)
0–10	140	503	10	221	200
0–10	140	503	20	323	200
10–25	140	665	20	485	200

[a] RT: retention time [b] CE: collision energy

4. 2. 10　タンパク質定量法

タンパク質濃度の決定は、Bradford 法によって行った(Bradford, M. M., 1976)。また、標準タンパク質として BSA を用いた。

4. 2. 11　ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）は、7.5%ゲルを用い、Blue-Native PAGE（BN-PAGE）によって実施した(Schägger, H., and Jagow, G. V., 1991)。タンパク質はクマシーブリリアントブルー（CBB）または Periodic acid-Schiff (PAS) 染色によって可視化した(Zacharius, R. M. *et al.*, 1969; Jay, G. D. *et al.*, 1990)。

4. 3　インベルターゼの精製

4. 3. 1　酵素精製

たばこ乾燥葉には褐色色素をはじめとする多くの可溶性夾雑物が含まれている。メラノイジンは、加工食品に含まれる褐色色素の一つであり、巨大な分子質量と分子表面に電荷をもつ構造を持つことが知られている(Homma, S. *et al.*, 1997)。また、タンパク質やオリゴペプチドはメラノイジンの構成物として取り込まれることが近年報告されている(Smaniotto, A. *et al.*, 2009)。乾燥葉から酵素を精製しようとする場合、褐色色素と目的タンパク質との分離が重要になると考えられた。天然物から酵素タンパク質を精製する場合、精製初期操作として各種の沈殿分離が用いられている。しかし、乾燥葉からタンパク質を精製する場合、褐色色素の溶解度が目的タンパク質のそれに近く、硫酸アンモニウム沈殿や有機溶媒沈殿が有効ではなかった。一方、活性炭による処理は、褐色色素と目的酵素の分離を効率的に行い、比活性の向上に有効であった（図 4. 1)。

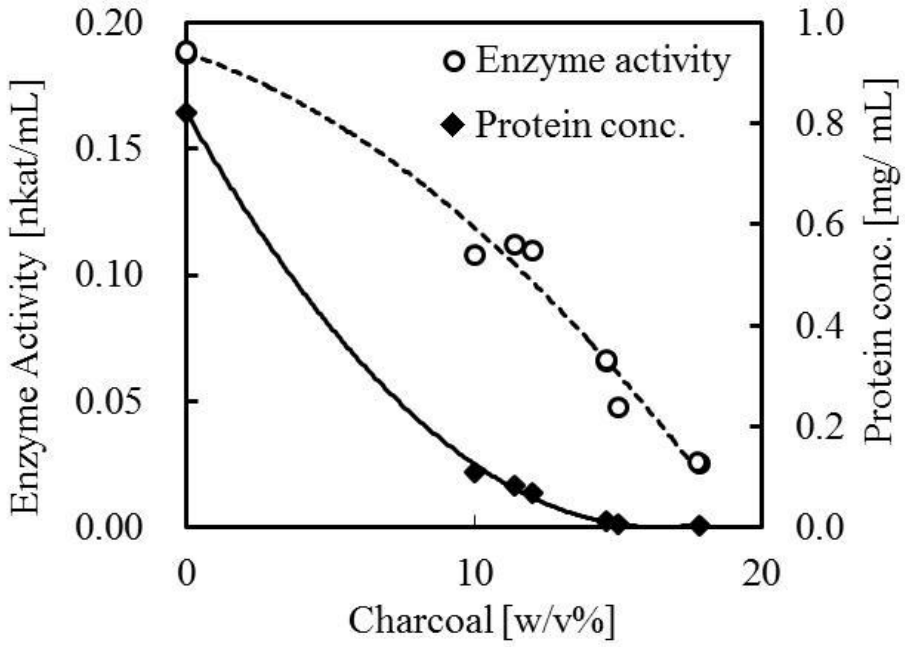


図 4. 1　活性炭量とタンパク質濃度および酵素活性の関係

12 w/v%量の活性炭で処理した酵素溶液については、セライトを用いて活性炭を除いたあと、限外濾過によって低分子化合物および残存した褐色色素を除去するとともに、酵素タンパク質を濃縮した。また、陰イオン交換クロマトグラフィー（Q sepharose Fast Flow）とレクチン担体固定化アフィニティークロマトグラフィー（Concanavalin A sepharose 4B）によって目的の酵素タンパク質の比活性はさらに向上した（表 4. 1)。これらの工程は褐色色素の除去に特に有効であり、処理後の溶液は淡い黄色を示した。アフィニティークロマトグラフィー後の溶液をさらにゲル濾過クロマトグラフィー（以後、GFC）によって分画した。

図 4. 2 は GFC のクロマトグラムを示している。図 4. 2 (A)は GFC 一回目のクロマトグラムの様子を示している。この時、前方の活性画分（図中で IV1+IV2 と表記）をクロマトグラフィー終了後に回収し、濃縮した。図 4. 2 (B)は回収した IV1+IV2 の画分の一部を再度 GFC で分画した様子を示している。結果として、ゲル濾過クロマトグラフィー上で 3 つのスクロース加水分解活性を有するピークが確認できた。溶出時間が早い順番に、IV1、IV2、IV3 とここで定義する。それぞれの精製度は、Crude extract に対して IV1: 414 -fold, IV2: 63 -fold, IV3: 28-fold であった。Crud extract の調製から GFC までの精製表を表 4. 1 に示した。

図 4. 2 (C)は、葉たばこから調製した酵素液の GFC による分画を示している。葉たばこ中の酵素抽出および精製の方法について、実験材料と方法 4. 2. 7 に記した。クロマトグラムの様子から分かるように、葉たばこから調製し酵素溶液中には、IV1 および IV2 の画分に活性は見られなかった。

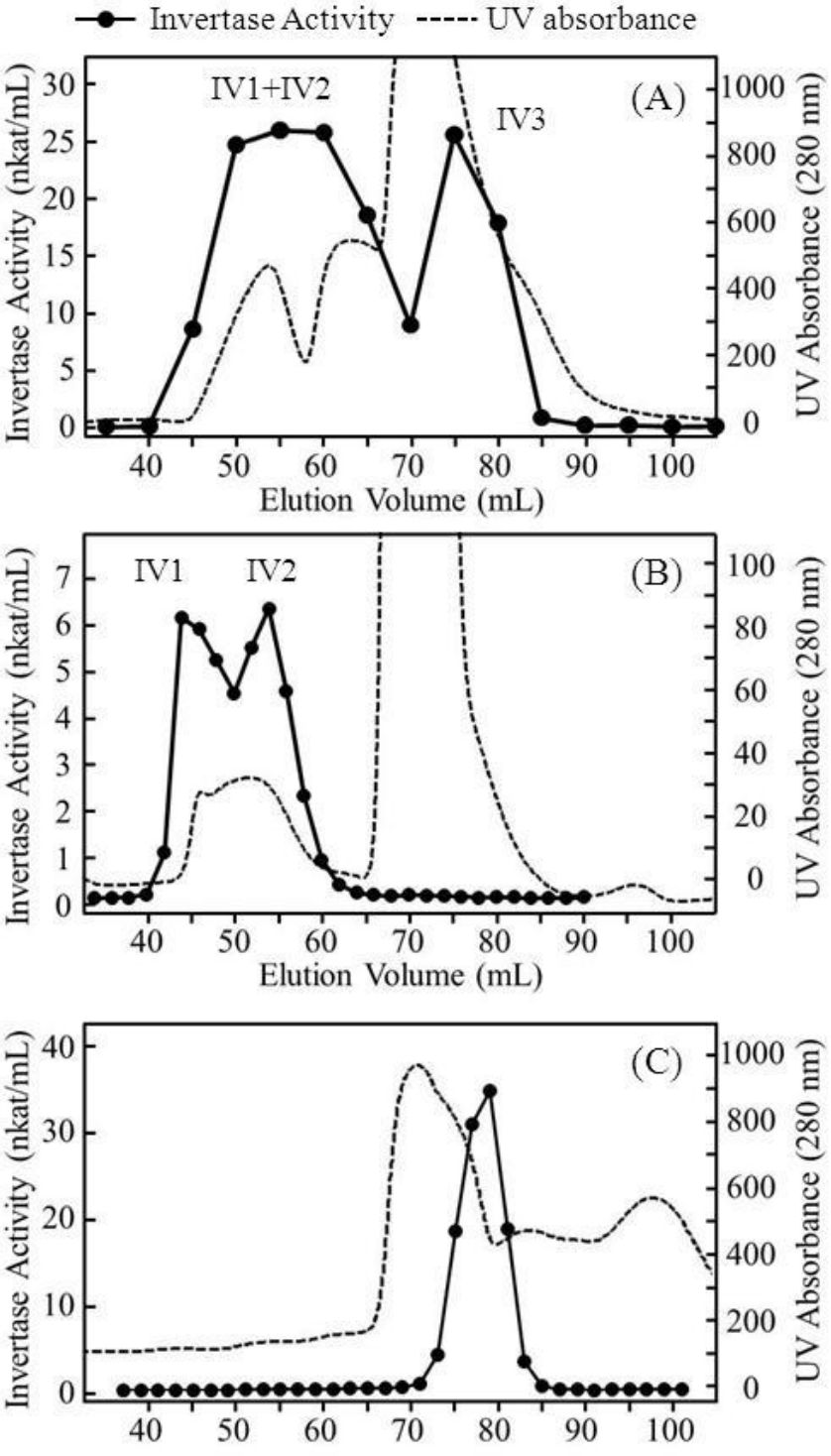


図 4. 2　各酵素液のゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）

(A,B) 乾燥葉から抽出・精製した酵素溶液（A: 1st load, B: re-load）

(C) 葉たばこから調製した酵素溶液

表4. 1　たばこ乾燥葉からのインベルターゼの精製表

Purification Step		Activity [a] [nkat [b]]	Protein [mg]	Specific activity [nkat/mg protein]	Yield %	Purification -fold
Crude extract		11175	3258	3.43		
Activated Charcoal Treatment [c]		3858	195	19.8	35	5.8
Q Sepharose		2267	71.3	31.8	20	9.3
Con A Sepharose		1204	10.3	117	11	34
Superdex 200 [d]	IV1	57	0.04	1420	0.5	414
Superdex 200	IV2	319	1.48	215	2.9	63
Superdex 200	IV3	172	1.82	94.4	1.5	28

[a] Defined as catalyzing the formation of glucose. [b] The amount of enzyme catalyzing the formation of 1 nmol glucose per second. [c] Includes ultrafiltration. [d] IV1 was purified by re-loading on GFC.

4. 3. 2　相対分子量に関する考察

GFC の溶出時間から、IV1 の相対分子質量（*Mr*）は 590 k であり、IV2, IV3 はそれぞれ 300k, 70k となった（図 4. 3）。

植物由来のインベルターゼは、一般に 50,000– 70,000 程度の相対分子質量を有する(Fotopoulos, V., 2005)。タバコに関する知見としては、培養細胞（*N. tabacum*, BY-2 cells）から単離された酸性インベルターゼの分子量がおよそ 70,000 である(Nakamura, M. *et al.*, 1988)。また、cDNA にコードされている細胞壁型インベルターゼの推定分子量は 61,000 という報告がある(Greiner, S. *et al.*, 1995)。これらの報告と今回の結果を比較すると、IV3 および、葉たばこから調製された酵素溶液が持つ活性画分は 70,000 程度の分子量域にあるが、IV1, IV2 はその相対分子質量は 4 倍から 8 倍以上と巨大である。

今回の活性画分の中で、最も精製度が高く、褐色色素とも分離が達成できている IV1 について、(±)-Dithiothreitol で還元処理した後に SDS-PAGE を行ったところ、レーン全体がスメア形状になり明確なバンドが確認できなかった。一方、Blue-native PAGE (BN-PAGE) を行ったところ、図 4. 4 のようなメジャーバンドが確認できた。また、ゲル上のタンパク質は CBB だけでなく PAS 染色によっても可視化されたことから、IV1 は糖タンパク質か、それとも糖質と不可逆的な分子間相互作用を起こしているか、何らかの形で糖質構造を保有しているものと考えられる。

界面活性剤の有無、塩濃度増加など、GFC の溶離液の組成を変更しても IV1 と IV2 の溶出パターンに大きな変化は見られなかった。

以上より、IV1 と IV2 は、他のタンパク質や糖質、あるいはメラノイド等の高分子と複合体を形成した一種の凝集状態にあると判断した。また、その状態でなお酵素活性を保持しているものと著者は考えている。

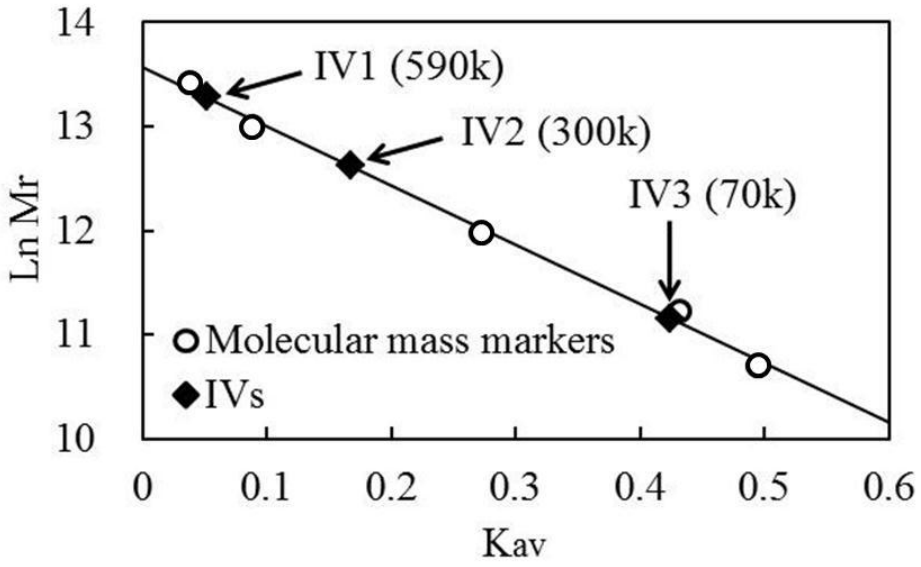


図 4. 3　ゲル濾過クロマトグラフィーによる相対分子量推定

Kav = (Ve-Vo)/(Vc-Vo)

Ve: elution volume, Vc: column volume, Vo: void volume*

*Void volume (Vo) was determined with blue dextrin.

Mr: relative molecular mass

Molecular mass markers:

Thyroglobulin (669k)

Ferritin (440k)

Aldolase (158k)

Conalbumin (75k)

Ovalbumin (44k)

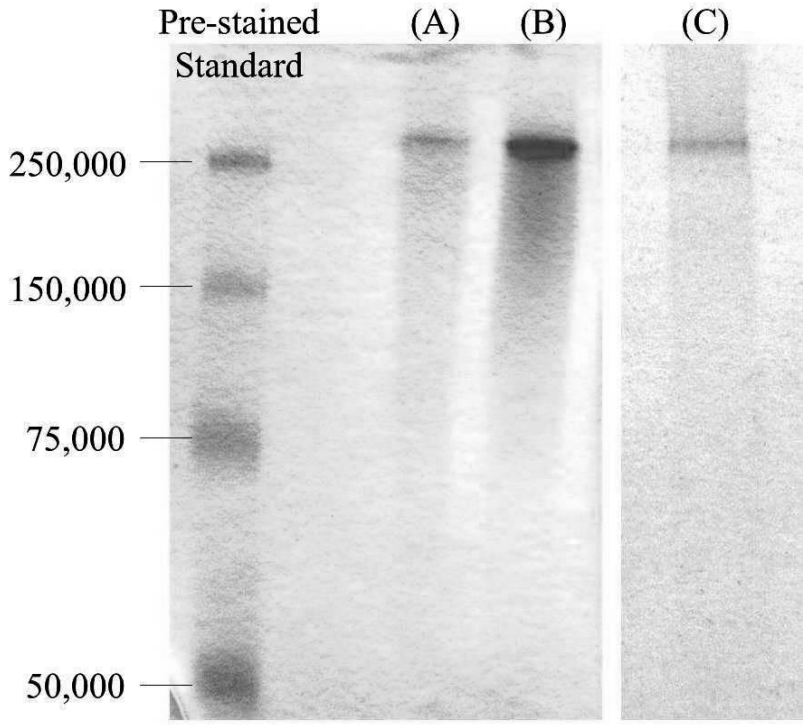


図 4. 4　IV1 のポリアクリルアミドゲル電気泳動と染色結果
タンパク質ロード量と染色方法は以下の通り : (A) 3 μg, CBB 染色, (B) 15 μg, CBB 染色, (C) 3μg, PAS 染色

4. 4　精製酵素の性質

精製した酵素について諸性質を調べた。本項では精製度の高い IV1 を中心にその基質特異性、フルクトース転移能、至適温度、至適 pH、金属イオンの影響、熱安定性などを調べた結果を報告する。

4. 4. 1　基質特異性

IV1 の基質特異性を表 4. 2 にまとめた。基質特異性は、スクロースを加水分解してグルコースを遊離させる活性を 100 としたときの相対活性としても表記した。IV1 は、ラフィノース、スタキオース、1-ケストースに対していずれも 70% 以上の相対活性で加水分解を起こした。一方、メレチトース、マルトース、トレハロースは殆ど加水分解活性を示さなかった。IV1 はフルクトフラノシル残基を認識していると考えられる。すなわち、スクロースの加水分解活性を示した IV1 はグルコース骨格を認識してスクロースを分解するスクラーゼ等とは区別された。IV2 と IV3 も同様にフルクトフラノシル残基を認識していたことから IV2、IV3 ともにインベルターゼに由来する活性であると予想した。

表 4. 2 からのスクロースを基質として用いた場合、遊離してくるグルコースとフルクトースの速度に違いがあった。ここから、IV1 のスクロースに対する反応が、加水分解以外に存在すると考えられた。

4. 4. 2　フルクトース転移能

図 4. 5 は、100 mM スクロース溶液中における IV1 の反応生成物を経時的に観測した PIC および MRM のクロマトグラムである。時間経過とともに 1-ケストースが生成していることが明らかとなった。同時に、ケストースの構造異性体と想定されるマイナーピークが同時に検出された。しかし、第 3 章にて乾燥

葉中で検出されたニストース（FOS DP4）は検出されなかった。同様の試験をIV2, IV3で実施したが、やはりニストースやフルクトシルニストースは生成しなかった。

表4. 2 IV1の基質特異性

Substrate [a]	Activity [nkat/mL] (Relative activity, % [b])	
	[Fru] [c]	[Glc] [c]
Sucrose	1.21 (90)	1.35 (100)
Raffinose	0.98 (73)	N.D.
Stachyose	1.03 (76)	N.D.
1-Kesotse	0.97 (72)	trace [e]
Melezitose	N.D. [d]	N.D.
Maltose	—	N.D.
Trehalose	—	trace

[a] 100 mM substrates were used in each test. [b] The rate of glucose formation using sucrose as a substrate is defined as 100%. [c] Fructose and glucose were quantified using F-kit. [d] N.D. means less than 0.03 nkat/mL. [e] trace means less than 0.07 nkat/mL.

Substrates : Structure
Sucrose : Glc-(α1↔2β)-Fru
Raffinose : Gal-(α1→6)-Glc-(α1↔2β)-Fru
Stachyose : Gal-(α1→6)-Gal-(α1→6)-Glc-(α1↔2β)-Fru
1-Kestose : Glc-(α1↔2β)-Fru-(β1↔2β)-Fru
Melezitose : Glc-(α1→3)-Fru-(β2↔1α)-Glc
Maltose : Glc-(α1→4)-Glc
Trehalose : Glc-(α1↔1α)-Glc

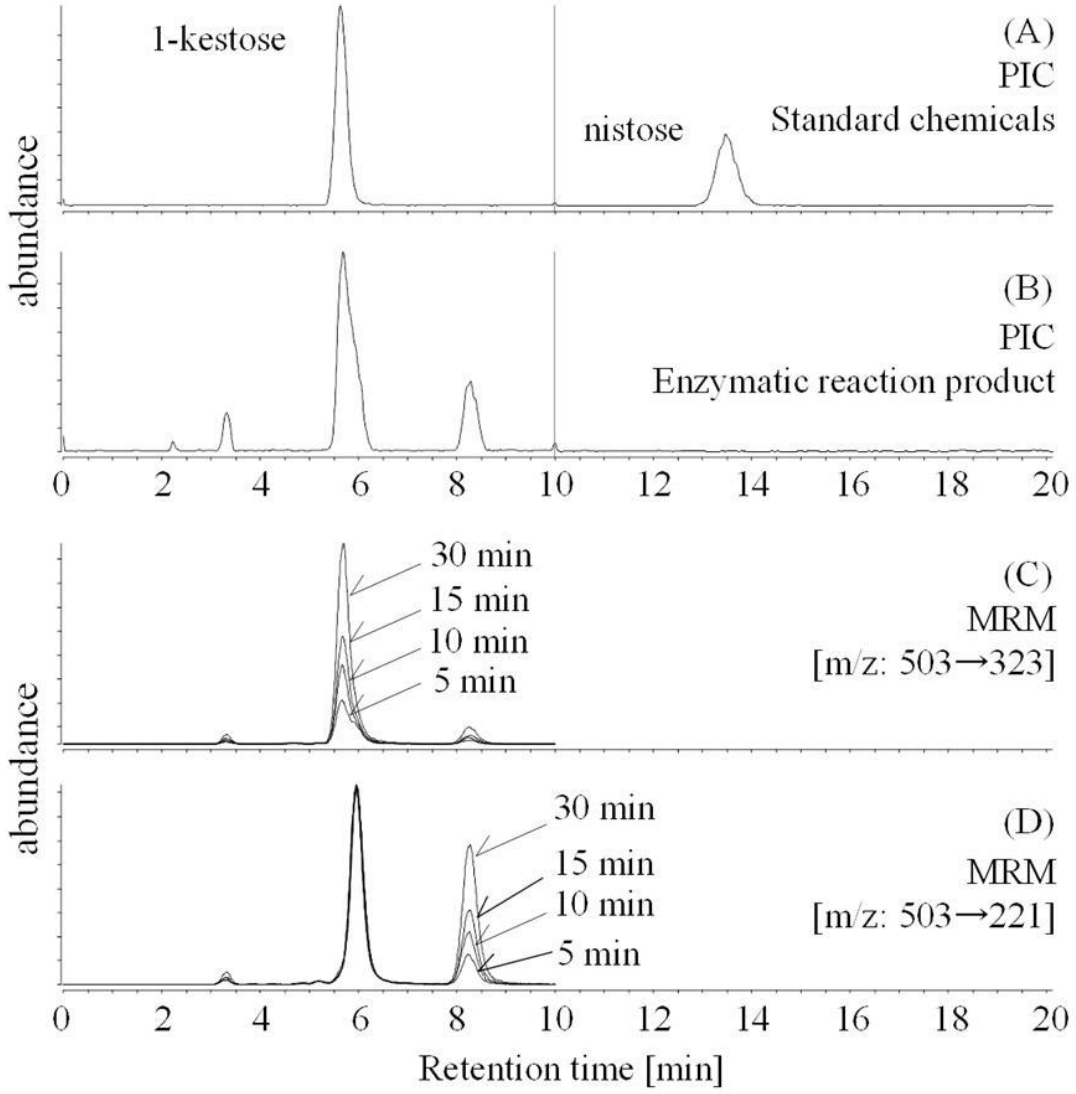


図 4. 5　100 mM スクロース溶液中における IV1 の反応溶液のプロダクトイオンクロマトグラフィー（PIC）と多重反応モニタリング（MRM）

(A): 標品の PIC, (B): 反応開始後 30 分の反応溶液の PIC

(C), (D): m/z 503 を前駆体イオンとする MRM クロマトグラム

4. 4. 3　至適温度

精製した酵素の至適温度を調べた結果、IV1 のスクロース加水分解反応、および糖転移反応の至適温度はともに 60°C であった（図 4. 6）。また、IV2 および IV3 の加水分解反応の至適温度は 55°C であった(図 4. 7)。

4. 4. 4　至適 pH

精製した酵素の至適 pH を調べた。IV1 のスクロース加水分解反応の至適 pH は 5.0 であった。一方、糖転移反応の至適 pH は 6.0 付近であった。また、加水分解反応は pH のシフトに伴って著しく活性が低下するのに対し、糖転移反応は pH 依存性が比較的低い結果となった（図 4. 8）。IV2 および IV3 の加水分解反応の至適 pH はそれぞれ、5.0 と 4.0 付近であった。IV2 は IV1 と至適 pH 帯が似ているのに対し、IV3 は異なる挙動を見せた（図 4. 9）。IV1、IV2、IV3 の至適 pH は酸性であり、精製した酵素はいずれも酸性インベルターゼであることが示唆された。

4. 4. 5　金属イオンの影響

酸性インベルターゼは、水銀イオンなどの重金属イオンによって活性阻害を受けることが知られている。これは、触媒活性にスルフィドリル基が関与しており、金属イオンがこれと相互作用するためと考えられている(Sturm, A., 1999)。Pyridoxal もまた、インベルターゼの阻害作用があることが報告されている(Pressey, R., 1968; Lopez, M. E. *et al.*, 1988)。精製した IV1 について、金属イオンと Pyridoxal の活性阻害の影響を調べた結果を表 4. 3 にまとめた。

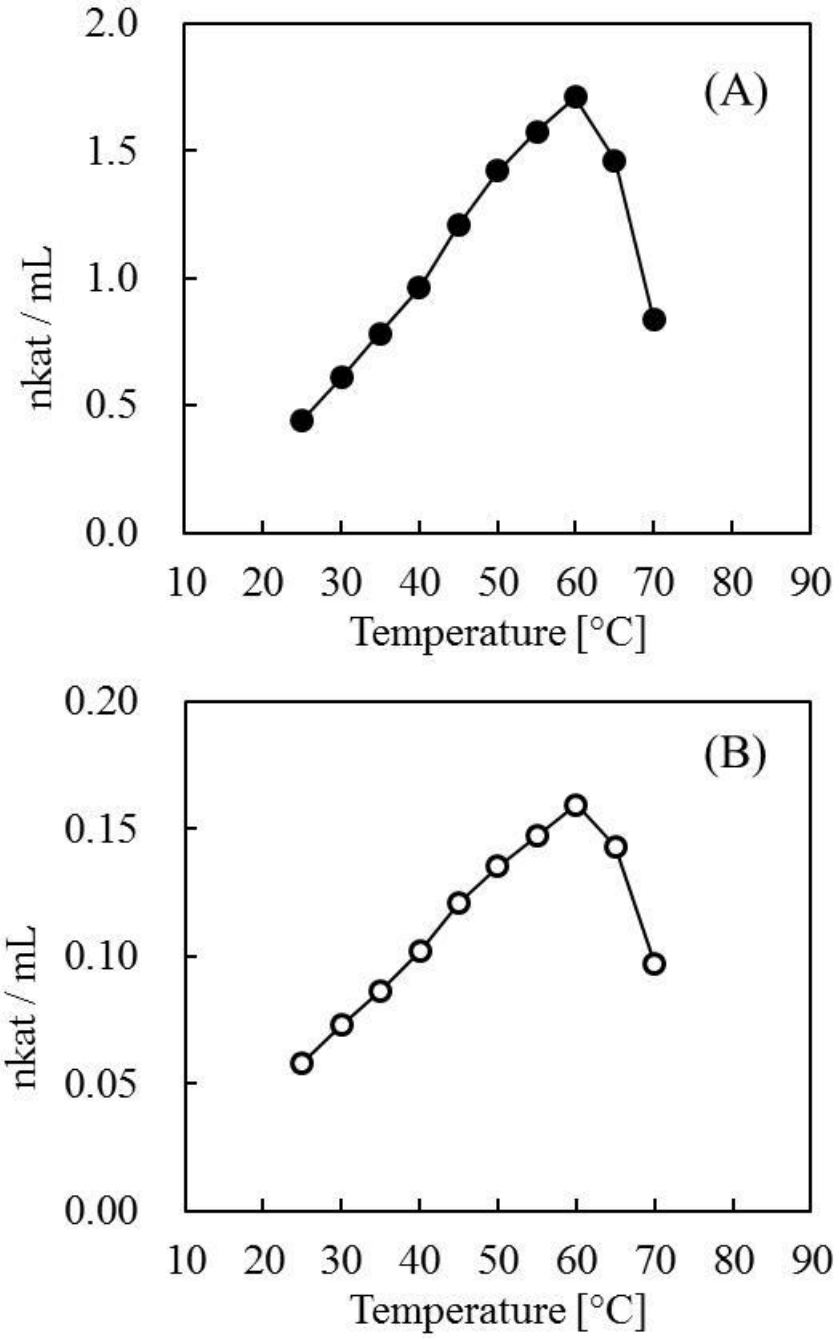


図 4. 6　IV1 の反応至適温度（25°C– 70°C）

(A) グルコース生成速度を観測

(B) 1-ケストース生成速度を観測

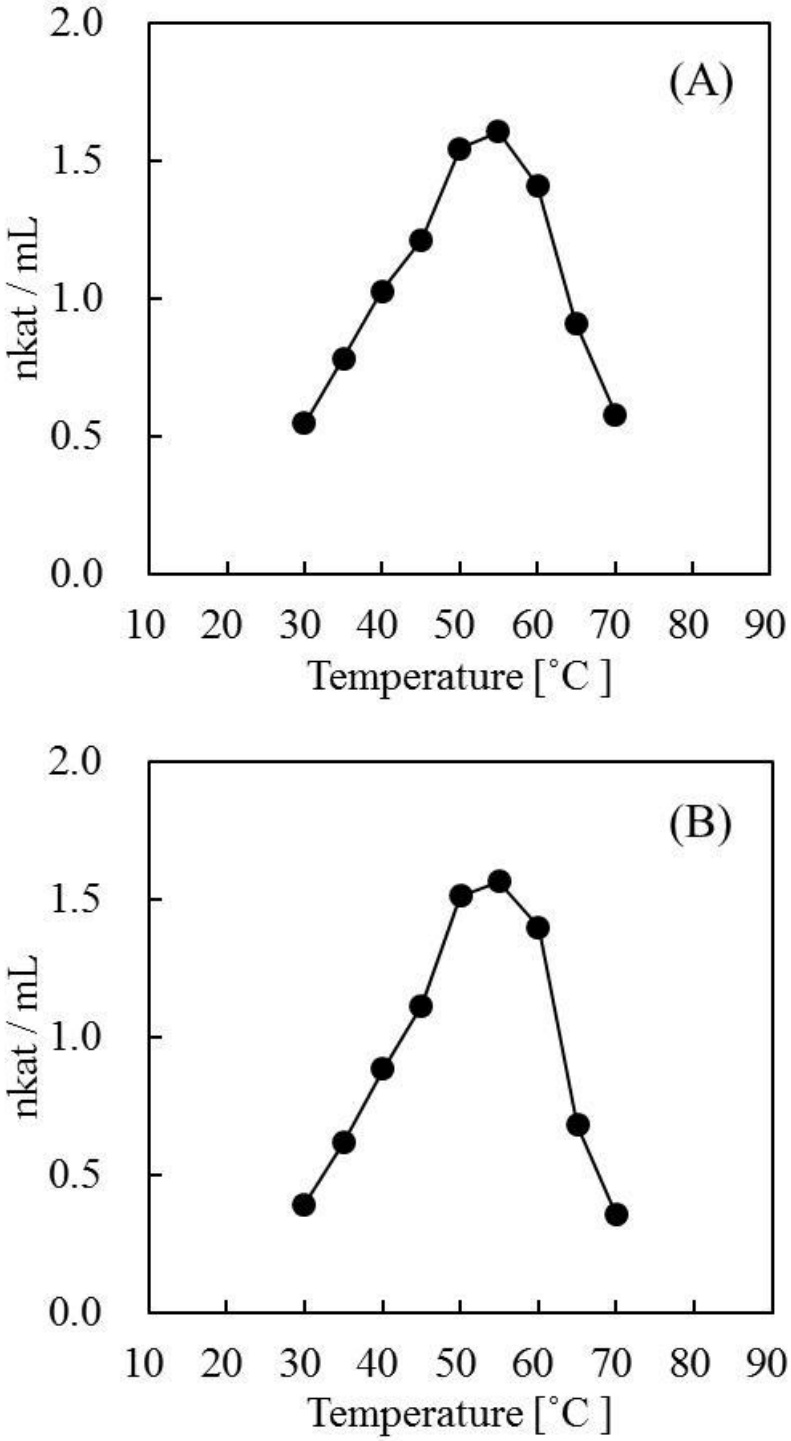


図 4. 7　IV2, IV3 の反応至適温度（25°C– 70°C）

(A) IV2：グルコース生成速度を観測

(B) IV3：グルコース生成速度を観測

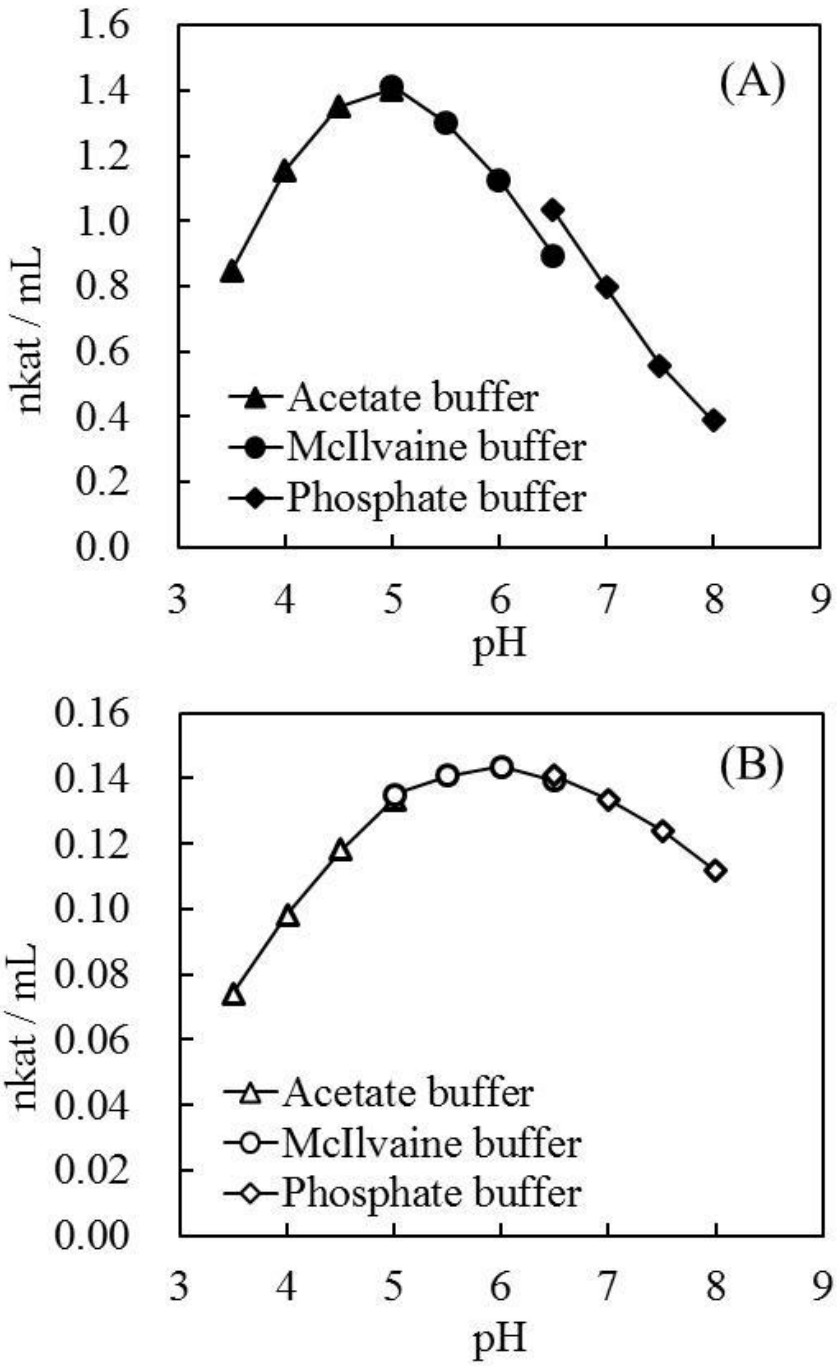


図 4. 8　IV1 の反応至適 pH（pH 3.5– 5.0 では酢酸緩衝液、pH 5.0– 6.5 では McIlvaine 緩衝液、pH 6.5– 8.0 ではリン酸緩衝液を用いた）

(A) グルコース生成速度を観測

(B) 1-ケストース生成速度を観測

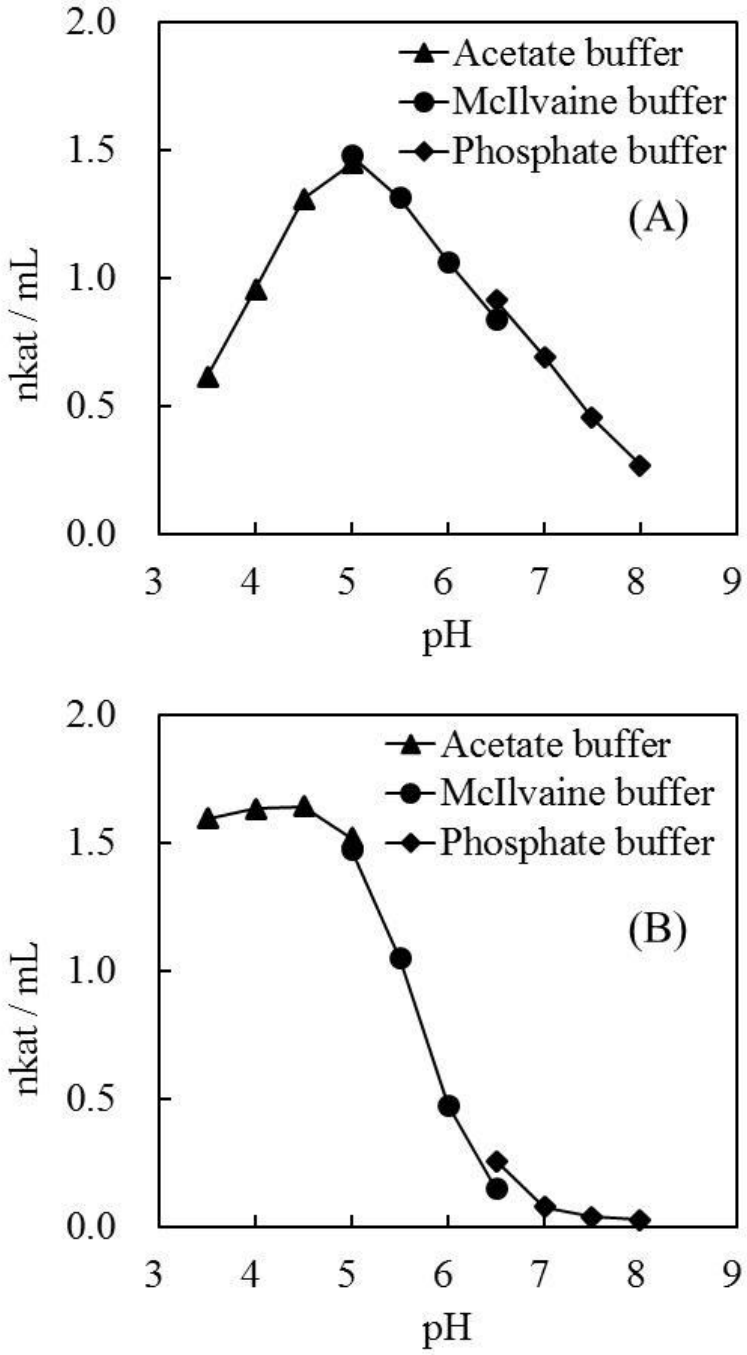


図 4. 9　IV2, IV3 の反応至適 pH（pH 3.5– 5.0 では酢酸緩衝液、pH 5.0– 6.5 では McIlvaine 緩衝液、pH 6.5– 8.0 ではリン酸緩衝液を用いた）

(A) IV2：グルコース生成速度を観測

(B) IV3：グルコース生成速度を観測

表4. 3　IV1の活性阻害

Metal ions / Concentrations	Glucose formation	1-Kestose formation
	Inhibition Rate %	Inhibition Rate %
200 mM $MnCl_2$	30.0±1.0	61.7±1.8
10 mM $CuCl_2$	60.6±0.4	53.8±1.0
10 mM $ZnCl_2$	29.4±1.2	34.7±0.2
10 μM $HgCl_2$	73.7±3.1	40.8±0.3
10 mM Pyridoxal	18.3±1.0	31.3±0.7

IV1 は銅イオン、亜鉛イオン、水銀イオン、そして Pyridoxal によって活性阻害を受けた。またわずかながらマンガンイオンによっても阻害された。一方、コバルトイオン、ニッケルイオンによる阻害作用は見られなかった。また、アルカリ土類金属（マグネシウムイオン、カルシウムイオン）も IV1 の酵素活性を阻害しなかった。また、金属種によって、阻害率に多少の差異はあるが、加水分解活性と糖転移活性の両活性とも阻害された。

4. 4. 6　酵素の熱安定性

精製酵素の熱安定性を調べた。IV1 を 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C の McIlvaine 緩衝液（pH 5.0）の中で、300 秒から 1800 秒加熱した後、4. 2. 8 に示した方法で活性測定を行った。結果を図 4. 10 に示した。IV1 は 55°C で 1800 秒加熱しても 70%以上の活性を維持した。60°C 以上に加熱すると失活速度が速くなることが分かった。同様の試験を IV2, IV3 についても実施したところ、IV2, IV3 は IV1 よりも熱安定性が低い傾向にあった（図 4. 11）。

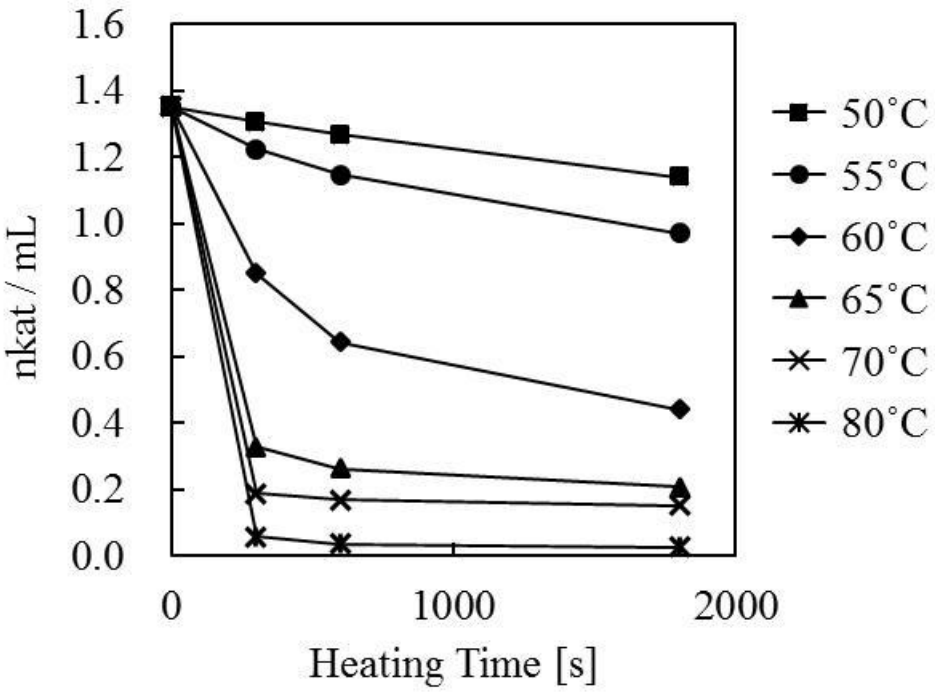


図 4. 10　IV1 の熱安定性。50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C の McIlvaine 緩衝液（pH 5.0）の中で、300 秒から 1500 秒加熱した後、4. 2. 8 に示した方法で活性測定を行った。

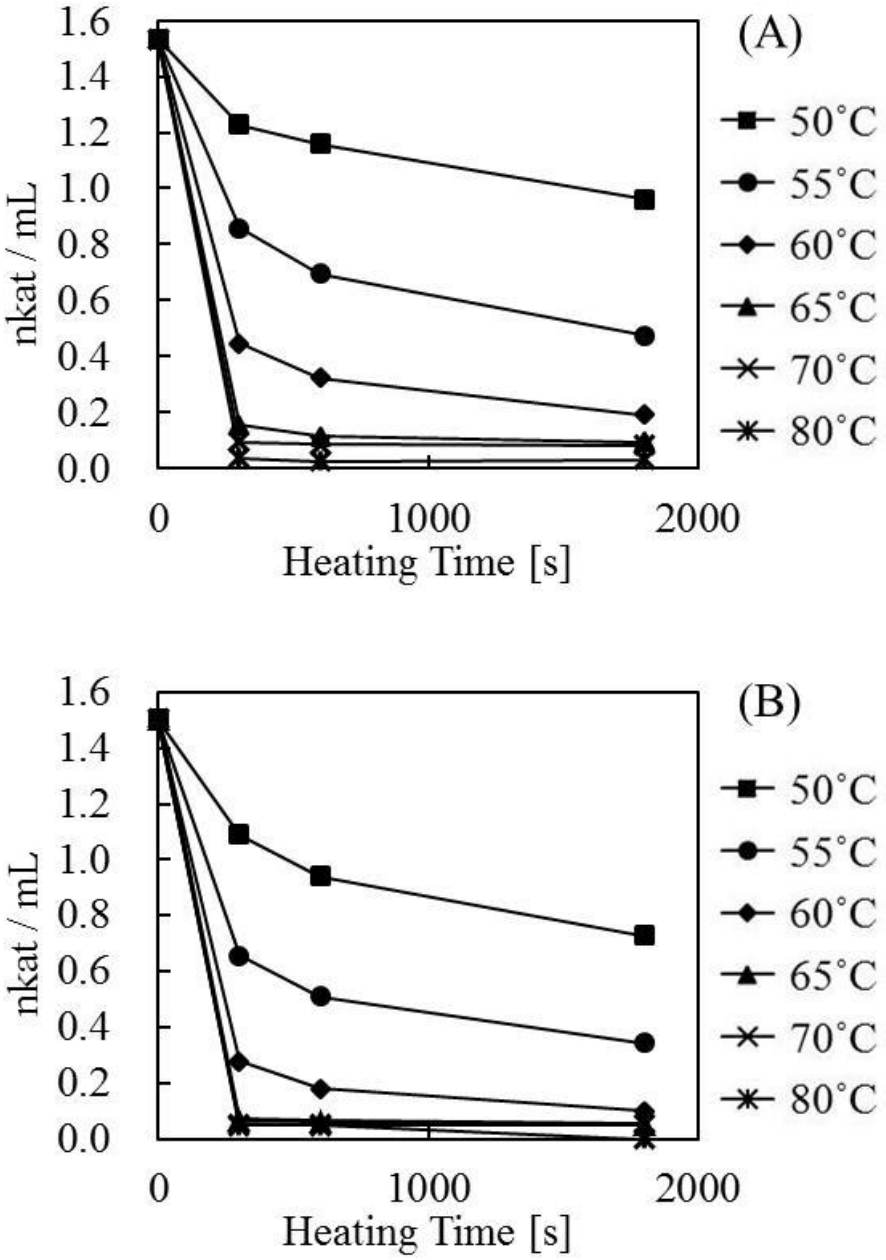


図 4. 11　IV2, IV3 の熱安定性。(A): IV2, (B): IV3.
50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 80°C の McIlvaine 緩衝液（pH 5.0）の中で、300 秒から 1500 秒加熱した後、4. 2. 8 に示した方法で活性測定を行った。

4. 5　フルクトース転移能と基質濃度の関係

ここまでの検討から、IV1 はグルコースと 1-ケストース、さらにはその異性体と想定されるフルクトオリゴ糖を生成するマルチファンクションの酵素であることが明らかとなった。 図 4. 12 は現時点で想定されるスクロースを基質とした IV1 の反応スキームを示している。

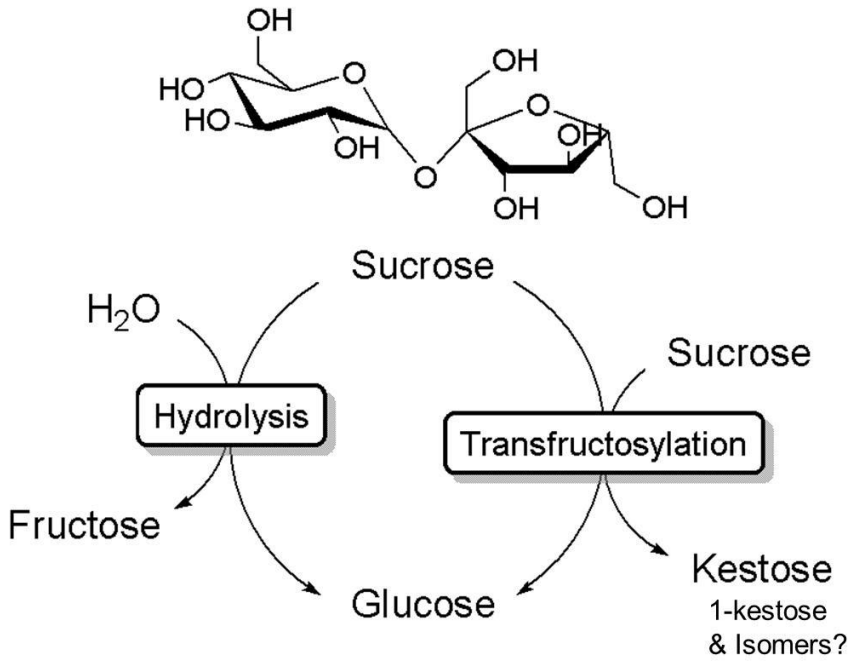


図 4. 12　IV1 によるスクロースの想定反応スキーム

本項では、グルコース生成速度と 1-ケストース生成速度について、基質濃度が及ぼす影響を調査した。図 4. 13 はスクロース濃度とそれぞれの生成物の生成速度の関係を示している。グルコースの生成速度は 1-ケストースの生成速度と比較し、低い基質濃度で飽和した。グルコース生成速度に対する 1-ケストースの生成速度の割合は基質濃度の上昇に従って増加した。すなわち、糖転移反応は基質が高濃度であるほど生じやすいことが明らかになった。

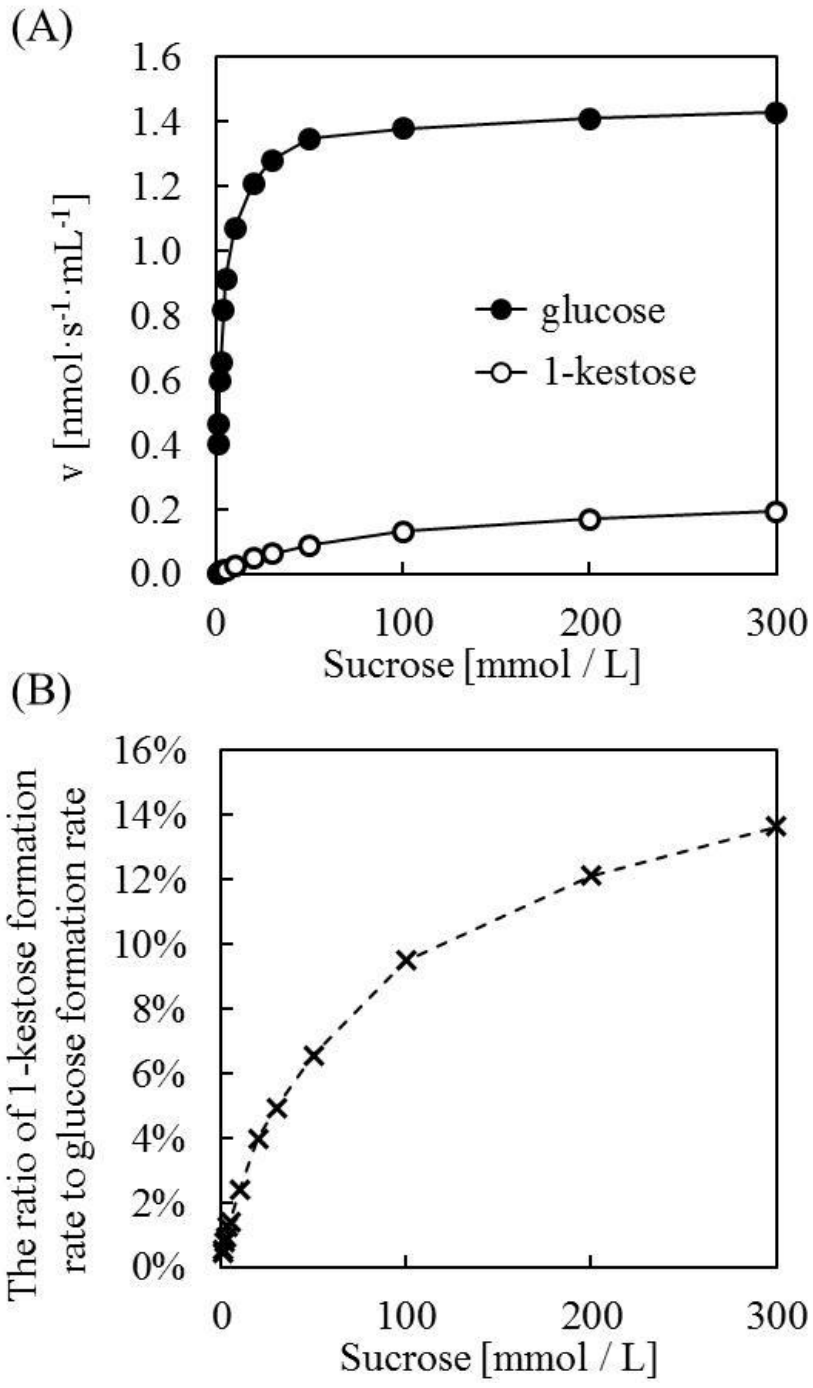


図 4. 13　スクロース濃度が IV1 の反応性に与える影響

(A): スクロース濃度とグルコースおよび 1-ケストース生成速度の関係

(B): グルコース生成速度に対する 1-ケストース生成速度の比率

4. 6　まとめと考察

本章では、乾燥葉で活性を示すインベルターゼを部分精製し、その性質を調べた結果を報告した。併せて、葉たばこから酵素液を調製して乾燥葉の持つスクロース分解活性と比較した。乾燥葉中には分子量分布が大きく異なるスクロース加水分解酵素 IV1、IV2、IV3 の 3 つがあり、少なくとも IV1 と IV2 の 2 つは葉たばこから調製した場合には見られない活性画分であった。それぞれの画分の諸性質を調べた結果、いずれも β-フルクトフラノシル残基を認識し、酸性に反応至適 pH を持つ酸性インベルターゼに由来する活性であったことが明らかになった。

植物が持つインベルターゼには、その反応至適 pH によって酸性インベルターゼ、中性インベルターゼ、アルカリ性インベルターゼがある。また別の視点として、植物のインベルターゼは生体内における局在部によって液胞型、細胞質型、細胞壁型の 3 タイプに分類される(Sturm, A., 1999)。一般に、液胞型と細胞壁型は至適 pH を酸性サイドに持ち、細胞質型は中性もしくはアルカリ性サイドに至適 pH を置くことが多い(Fotopoulos, V., 2005)。本章で扱った 3 つの活性酵素は、至適 pH を酸性サイドに持つため、液胞型もしくは細胞壁型のインベルターゼに由来するものと考えられる。また通常、液胞型インベルターゼは水溶性タンパクであり、細胞壁型は不溶性とされる。今回の場合、活性酵素タンパク質の構造が明らかでなく、特に IV1 と IV2 については 4. 3. 2 で一部すでに考察したように、他の化合物と凝集した構造をとっていると推論している。したがって、酵素タンパク質の溶解度などの物性が変化している可能性があるため、今回の検討結果から生体内における局在場所の同定には至らなかった。

IV1 と IV2 が IV3 に由来する凝集物であるか否かについて考察すると次のようになる。まず、IV3 に関しては、GFC 上の IV3 の溶出時間から相対分子量は約

70,000 と推定される。また、レクチン担体固定化クロマトグラフィーによって保持されたことから、IV3 は糖タンパク質である。一方、Nakamura らによって報告されているタバコ培養細胞中のインベルターゼは糖タンパク質であり、その分子量はおよそ 70,000 である(Nakamura, M. *et al.*, 1988)。さらに至適 pH が約 4.0 と近しい値を見せている。タバコに限らず、植物が有するインベルターゼの分子量はおよそ 55,000– 70,000 に分布する。さらに葉たばこから調製した酵素溶液を GFC で展開した時、IV3 と同じ溶出時間に活性が見られた。これらの結果から、IV3 の分子サイズはタバコ由来のインベルターゼとして妥当であり、葉たばこ生育中から発現している酵素である可能性が高い。IV1 と IV2 が、IV3 と葉たばこ中に存在した他の化合物との凝集物である可能性を考え、各画分の諸性質を比較した。至適温度は IV1 が 60°C、IV2 と IV3 は 55°C であった。至適温度に大きな違いはないが、pH の影響は IV3 のみ挙動が異なった（図 4. 8、図 4. 9 参照)。また、各画分の温度安定性を調べたところ、熱安定性は IV1 > IV2 > IV3 の順に安定性が高い傾向にあることが分かった（図 4. 10、図 4. 11 参照)。これらの性質の違いが IV3 の凝集によって起こったのか、それとも全く異なる酵素に由来するためなのかについては、今後、葉たばこの乾燥工程中の酵素の状態変化を経時的に観測することによって明らかになると思われる。

第 3 章で論じた乾燥葉中のフルクトオリゴ糖の生成について、本章の検討結果から考察する。今回精製した活性画分はいずれもスクロースからケストースを生成する機能を持ち合わせていた。また、IV1 を用いた両反応の重金属イオンによる阻害作用を確認したところ、同一の金属イオン種によってグルコース、1-ケストースの生成ともに阻害されたことから、両反応ともインベルターゼの活性に由来すると考えられた（表 4. 3 参照)。IV1 を用いてスクロース濃度と各化合物の生成速度の関係を調査した結果、スクロース濃度の上昇に伴いグルコー

ス生成速度に対する 1-ケストースの生成速度比が高まることが分かった（図 4.13 参照)。すなわち、基質濃度が上昇すると加水分解に対する糖転移反応の割合が向上することを意味した。第 3 章の保存試験に供した乾燥葉は、その含水率がおよそ 10%D.B 程度である。自由水の存在割合を考慮すると、反応場としての水分含量はさらに低いことが予想される。一方、葉たばこ中では少なくとも 300%D.B.の水分を有する。スクロースは乾燥葉中では、高度に濃縮されていると考えると、葉たばこ中では生じにくい糖転移反応が乾燥葉中で比較的優位に生じた可能性が挙げられる。葉たばこ収穫後の Curing 過程における細胞破壊およびそれに伴う成分の非局在化など未知な部分は多いが、低水分環境という反応場は、乾燥葉中にのみ生じる特殊な反応系の理由の一つになると考えられる。

第 5 章

たばこ乾燥葉中に残存する酵素活性

5. 1　序

たばこ乾燥葉中で酵素活性を示すインベルターゼが、乾燥葉保存中のスクロース安定性に影響を与えることを第 2 章で示した。さらに、乾燥葉保存中において、インベルターゼは副反応として新たな糖を生成させることを第 4 章まで述べた。葉たばこが収穫後、Curing、Threshing、Aging と高度に加工され、10– 12%程度の低含水量の乾燥葉に仕上がるが、乾燥葉中において一種類の酵素が引き起こす様々な影響について論じてきた。ここまで、スクロースの経時変化を端に発し、その機構について酵素学的な視点から検討してきたが、乾燥葉中に残存している酵素活性はインベルターゼに限らないことが予想できた。乾燥葉中に残存する酵素活性に関する理解を深め、乾燥葉保存中の品質管理に資する更なる知見の獲得することを目的とし、本章ではインベルターゼ以外の酵素について活性残存を確認することにした。ここでは糖質関連酵素に焦点を置き、α-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼの酵素活性について調べた。

フランスの生化学者 Anselme Payen と Jean-François Persoz によって、世界で初めて単離された酵素として知られるアミラーゼは、デンプンやグリコーゲンを基質とする加水分解酵素であり、動物、植物、微生物に広く分布する。アミラーゼは認識する単位構造によって数種類に分けられる(Vandermaarel, M. J. E. C. *et al.*, 2002)。α-アミラーゼ (α-amylase: 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) は、endo 型酵素でありグルコース残基の α-1,4 結合を認識してランダムに加水分解する。結果として重合度が広く分布したデキストリンが生成する。β-アミラーゼ (β-amylase: 1,4-α-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.2) は exo 型酵素であり、糖鎖末端を認識して二糖単位で加水分解し、マルトースを生成させる。グルコアミラーゼ(Glucoamylase: 1,4-α-D-glucan glucohydolase, EC 3.2.1.3) もまた exo 型酵素であり、これは単糖単位で加水分解してグルコースを生成させる。さ

らに exo 型で作用する酵素の中にはグルコース残基 4 つの縮合単位で遊離させる酵素(1,4-α-D-glucan maltotetraohydrolase, EC 3.2.1.60) や 6 つの縮合単位で遊離させる酵素(1,4-α-D-glucan maltohexaohydrolase EC 3.2.1.98) なども報告されている(Robyt, J. F., and Ackerman, R. J., 1971; Momma, M., 2000)。イソアミラーゼ(Isoamylase: glycogen α-1,6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.68) はアミロペクチンの糖鎖分岐部を加水分解する酵素である。

α-グルコシダーゼ(α-glucosidase: α-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) は α-1,4 グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素である。非還元性末端 α-1,4 グリコシド結合を加水分解するという点において、先に述べたグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3) と見かけ上区別する事が難しい。しかし、遊離したグルコースの 1 位の立体配置が保持されている(α-anomer) か、反転している(β-anomer) かによって、両者の酵素は反応機構上明確に区別される(千葉誠哉, 1995)。α-グルコシダーゼはマルトースやマルトオリゴ糖のような低分子の基質とのみ親和性を示すものと、低分子から高分子まで幅広く分解する酵素がある。前者の場合はグルコアミラーゼと明確に区別されるが、後者の場合は両酵素が共存した場合において、どちらの酵素に由来した反応であるかを見分けにくくなる(千葉誠哉, 1995)。ただし、多くの場合 α-グルコシダーゼは低分子基質を好み、デンプンのような巨大分子とは反応しにくく、グルコアミラーゼはその逆であるため、本章では低分子基質の α-1,4 グリコシド結合の加水分解活性は α-グルコシダーゼによるものと定義する。

β-グルコシダーゼ(β-glucosidase: β-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) は非還元性 β グルコシド結合を加水分解してグルコースを遊離させる酵素である。α-グルコシダーゼと同様、動植物に広く分布し、異化代謝に関わっている。

緒言で述べたように、糖質はたばこ乾燥葉の品質に影響を与える重要な成分である。デンプン含量の高い乾燥葉は、燃焼時の香味が悪くなる傾向にあるため、デンプンの異化代謝は葉たばこの Curing における重要な目的の一つとなっている。乾燥葉中に残存するアミラーゼは乾燥葉保存中にデンプン組成を変化させる可能性がある。α-グルコシダーゼは、乾燥葉保存中のマルトオリゴ糖組成に影響を与える可能性がある。一方、乾燥葉中には、様々な配糖体が含まれていることが知られている。配糖体のアグリコンは芳香を持つことがあるため、乾燥葉の品質との関連性が指摘されている。β-グルコシダーゼは配糖体加水分解酵素でもある。そこで、数多ある糖質関連酵素の中でもまず、以上述べた酵素に注目した。本章では、第 4 章まで議論してきたインベルターゼと併せて、上記酵素の乾燥葉中における残存活性を定量した結果を報告する。乾燥葉中で高い活性を示す酵素が何かについて、また、その活性量の原料種ごとに差異について検討した結果を報告する。

5. 2　実験材料と方法

5. 2. 1　材料

試験検体として、バージニア種（米国産、ブラジル産、日本産）、バーレー種（米国産、ブラジル産、日本産）、オリエント種（ギリシャ産、トルコ産）の 8 種類の乾燥葉を用いた。検体の水分含量は 9– 12%であった。検体の水分を第 2 章 2. 2. 5 水分測定と同様に行って測定し、乾燥葉中の各種酵素活性量を乾物重量当（Dry basis, D.B.）として表記した。スクロース、D-グルコース、酵素反応生成物の検量線作成用試薬（4-ニトロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール）、緩衝液の作成に用いた各種試薬（クエン酸、リン酸二水素ナトリウム 2 水和物、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物、酢酸、酢酸ナトリウム 3 水和物）は和光純

薬工業から購入して使用した。4-ニトロフェニル α-D-グルコピラノシド、4-ニトロフェニル β-D-グルコピラノシドはシグマ・アルドリッチから購入して用いた。

5. 2. 2　粗酵素液の調製法

乾燥葉を粉砕機（Nara Machinery Co., Ltd.）を用いて 0.5-1.0 mm メッシュに粉砕した。以降の操作はすべて 4°C 以下で行った。粉末状原料 2.0 g をガラスバイアルに秤量し、あらかじめ氷冷しておいた 100 mL McIlvaine 緩衝液（15 mM〔4.8 mM クエン酸－10.2 mM リン酸水素二ナトリウム〕、pH 5.4）を加えた。検体をホモジナイズし、さらに超音波抽出処理を 30 分間行った。ホモジネートを Whatmann #60 で濾過し、濾液を 12,000 ×g、10 分間遠心した。上清はさらに孔径 0.2 μm のセルロースアセテートメンブレン（Whatmann, GE Healthcare UK Ltd.）を用いて濾過した。この濾液を一次液とし、α-アミラーゼ活性の測定には一次液の一部を粗酵素液として用いた。この調製液は、0.02 g 相当の原料抽出物が 1 mL 中に溶解した濃度とした。

一次液の 30 mL を分取し、30 kDa 限外濾過膜（Amicon Ultra、遠心式限外濾過チューブ×2）を用いて低分子化合物を除去した。濃縮液を抽出に使用した緩衝液によって希釈し、再び限外濾過を行う作業を 2– 3 回繰り返して洗浄した後、抽出に使用した緩衝液を用いて 6 mL にメスアップした。これをインベルターゼ活性測定用の粗酵素液として用いた。最終的に調製液は、0.1 g 相当の原料抽出物が 1 mL 中に溶解した濃度とした。

一次液の 30 mL を分取し、30 kDa 限外濾過膜（Amicon Ultra、遠心式限外濾過チューブ×2）を用いて低分子化合物を除去した。濃縮液を 5 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）によって希釈し、再び限外濾過を行う作業を 2– 3 回繰り返して洗浄した後、5 mM 酢酸緩衝液（pH 5.5）を用いて 6 mL にメスアップした。これを α-グルコ

シダーゼおよび β-グルコシダーゼ活性測定用の粗酵素液として用いた。この調製液は、0.1 g 相当の原料抽出物が 1 mL 中に溶解した濃度とした。

5. 2. 3　酵素活性測定条件について

各酵素活性測定条件を表 5. 1 にまとめた。各酵素のアッセイは、基本的に調製した粗酵素液の至適 pH、至適温度で実施することとした。α-アミラーゼの活性測定は、活性測定用試薬の指定反応条件に準じた。インベルターゼは至適温度が 55°C であるが、酵素の熱安定性の高い 40°C で実施した。反応時間は、生成物の増加率が一定速度である領域を選択した。以下、各アッセイの詳細を個別に記述する。

5. 2. 4. インベルターゼ活性測定法

インベルターゼの活性測定法は第 2 章 2. 2. 3 の方法に準じた。

5. 2. 5　α-アミラーゼ活性測定法

α-アミラーゼの活性測定には、α-アミラーゼ測定キット（キッコーマン食品株式会社）を用いた。このキットの活性測定メカニズムは、2-クロロ-4-ニトロフェニル 6^5-アジド-6^5-デオキシ-β-マルトペンタオシド（N3-G5-β-CNP）を基質とし、α-amylase と反応して遊離した分解物を共存酵素試薬（グルコアミラーゼおよび β-グルコシダーゼ）の働きによって 2-クロロ-4-ニトロフェノール(CNP)を遊離させるものである。アルカリ試薬によって反応を停止し、塩基性の pH 環境下で発色が最大となる CNP を測定する。本法では α-アミラーゼ活性を特異的に測定でき、試料中のグルコアミラーゼや α-グルコシダーゼの影響を受けない。手順は基本的にメーカー取扱説明書に準じ、反応時間のみ 60 分とした。酵素活

性は、1 秒間に 1 nmol の CNP を遊離させる酵素量を 1nkat と定義し、反応溶液中の酵素濃度から最終的に原料重量当に換算した。

5. 2. 6　α-グルコシダーゼ活性測定法

10mM、pH 5.5 に調製した酢酸緩衝液 1.0 mL と作製した粗酵素液 100 μL をエッペンドルフチューブ内で混合したものを 2 本準備し、45°C に設定したヒートブロックで 2 分間加温した。一方のチューブに 20 mM 4-ニトロフェニル α-D-グルコピラノシド（Glc-α-pNP）溶液を 500 μL 加えて 30 分間インキュベートし、50 mM 炭酸ナトリウム溶液を 400 μL を加えて反応を停止した。もう一方のチューブはインキュベート後、50 mM 炭酸ナトリウム溶液を 400 μL を加えて反応を停止した後に Glc-α-pNP 基質溶液を 500 μL 加えた（発色ブランク）。Glc-α-pNP はアルカリ性溶液中で徐々に分解して発色強度が増すため、吸光度測定は反応終了後速やかに行った。反応液中の遊離 pNP 濃度を、405 nm 波長の吸光度から算出した。酵素活性は、1 秒間に 1 nmol の 4-ニトロフェノール（pNP）を遊離させる酵素量を 1nkat と定義し、反応溶液中の酵素濃度から最終的に原料重量当に換算した。

5. 2. 7　β-グルコシダーゼ活性測定法

10mM、pH 5.5 に調製した酢酸緩衝液 1.0 mL と作製した粗酵素液 100 μL をエッペンドルフチューブ内で混合したものを 2 本準備し、45°C に設定したヒートブロックで 2 分間加温した。一方のチューブに 20 mM 4-ニトロフェニル α-D-グルコピラノシド（Glc-β-pNP）溶液を 500 μL 加えて 15 分間インキュベートし、50 mM 炭酸ナトリウム溶液を 400 μL を加えて反応を停止した。もう一方のチューブはインキュベート後、50 mM 炭酸ナトリウム溶液を 400 μL を加えて反応を

停止した後に Glc-β-pNP 基質溶液を 500 μL 加えた（発色ブランク）。Glc-β-pNP はアルカリ性溶液中(pH 9.5)でも安定であるが、吸光度測定は反応終了後速やかに行った。反応液中の遊離 pNP 濃度を、405 nm 波長の吸光度から算出した。酵素活性は、1 秒間に 1 nmol の 4-ニトロフェノール（pNP）を遊離させる酵素量を 1nkat と定義し、反応溶液中の酵素濃度から最終的に原料重量当に換算した。

5. 3　種々のたばこ乾燥葉中に残存する糖質関連酵素活性の定量

5. 2 で述べた方法を用いて、バージニア種、バーレー種、オリエント種を含む 8 種類の乾燥葉中の各種酵素活性を定量した。定量結果を図 5. 1 に示した。種々の乾燥葉から今回測定した 4 種の酵素活性が検出された。また、その残存度合は乾燥葉によって異なり、また乾燥葉の種類によって残存する酵素活性のパターンが異なった。インベルターゼと α-アミラーゼは傾向としてバージニア種の原料中で比較的高い活性を示した (図 5. 1 (A), (B))。α-グルコシダーゼと β-グルコシダーゼはバーレー種のみ高い活性を示した(図 5. 1 (C), (D))。

表5. 1　各種酵素活性の測定条件

Enzyme Activity	MW cut off	pH	Temp.	Time	Quench	Substrate	Product	ABS detection	Quantification
	−		℃	min				wavelength	(molecular)
Invertase	30k-	5.0	40	5−20	alkalization	Sucrose	Glucose*	340 nm*	Lambert-Beer law (NADPH)
α-amylase	−	5.0	37	10−60	alkalization	N3-G5-β-CNP	CNP	400 nm	Calibration curve (CNP)
α-glucosidase	30k-	5.5	45	30	alkalization & cooling	pNP-α-Glucoside	pNP	405 nm	Calibration curve (pNP)
β-glucosidase	30k-	5.5	45	15	alkalization	pNP-β-Glucoside	pNP	405 nm	Calibration curve (pNP)

* Glucose was quantified with the hexokinase method.

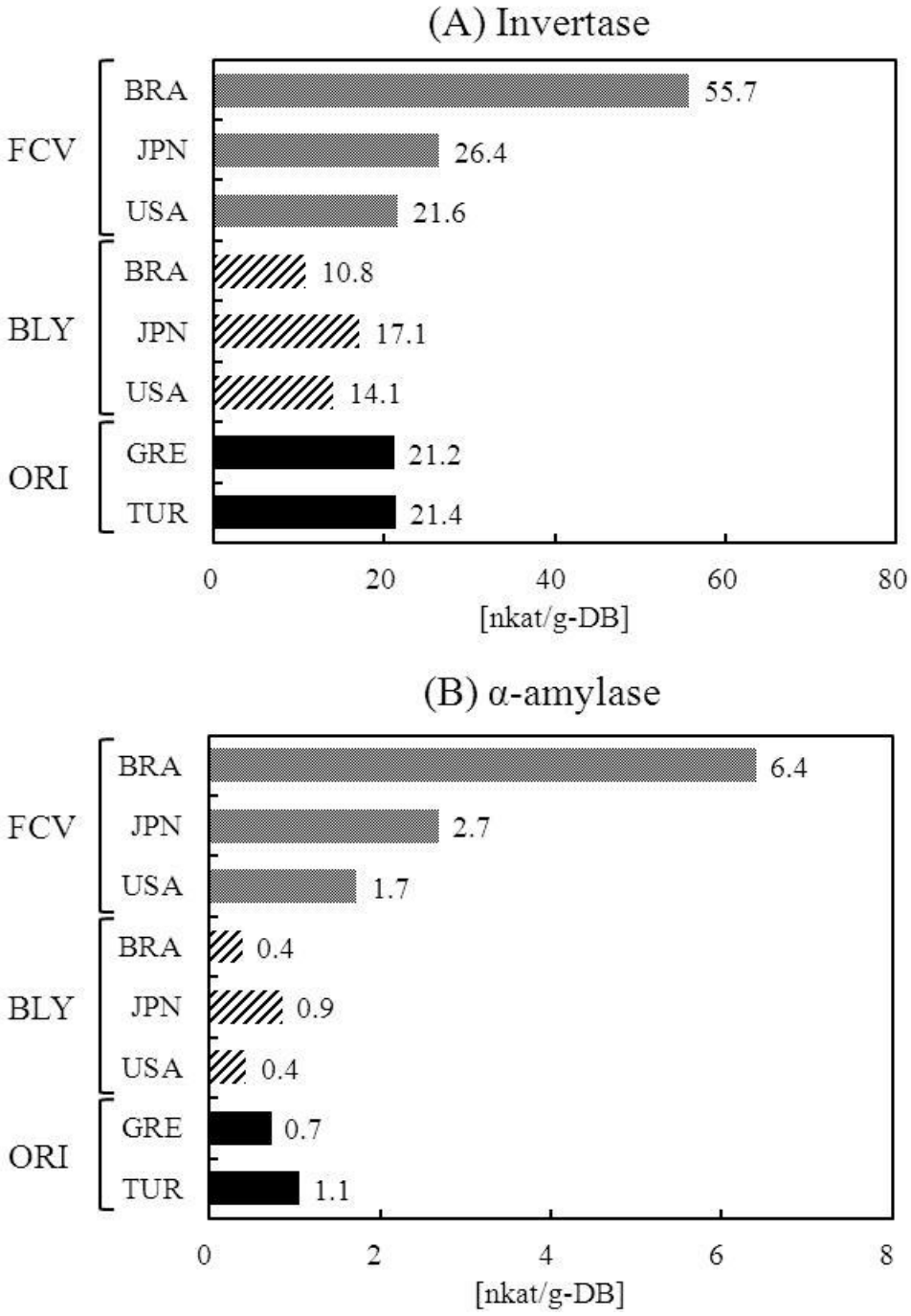


図 5. 1　各乾燥葉中に残存する酵素活性量

(A): インベルターゼ, (B): α-アミラーゼ, 略記の意は以下の通り。

FCV: Flue-cured Virginia（バージニア種）、BLY: Burley（バーレー種）、

ORI: Oriental leaf（オリエント種）、USA: 米国産、BRA: ブラジル産、

JPN: 日本産、TUR: トルコ産、GRE: ギリシャ産。

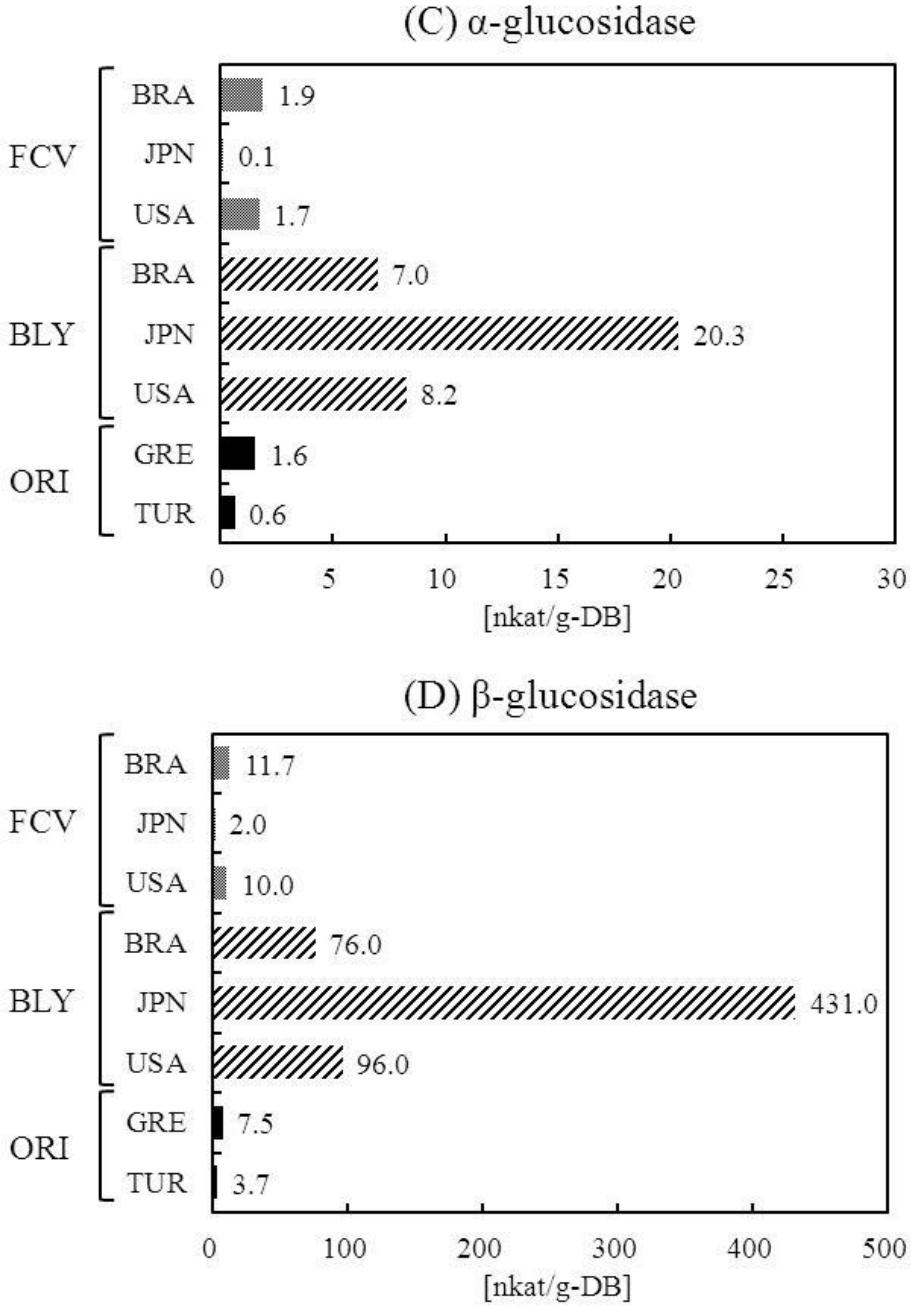


図 5. 1　各乾燥葉中に残存する酵素活性量

(C): α-グルコシダーゼ, (D): β-グルコシダーゼ, 略記の意は以下の通り。FCV: Flue-cured Virginia（バージニア種）、BLY: Burley（バーレー種）、ORI: Oriental leaf（オリエント種）、USA: 米国産、BRA: ブラジル産、JPN: 日本産、TUR: トルコ産、GRE: ギリシャ産。

5. 4　まとめと考察

本章では、種々の乾燥葉中の糖質関連酵素についてアッセイ系を構築し、これらを定量した。結果として、インベルターゼ、α-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼの活性量は原料によって異なり、また活性量のパターンは一律ではなく、乾燥葉の種類によって活性量が多い酵素と少ない酵素があった。インベルターゼとα-アミラーゼはバージニア種で高い活性を示す傾向にあり、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼはバーレー種が他品種と比較して高活性を示した。α-アミラーゼやインベルターゼの活性が、葉たばこの乾燥法としては処理強度が強いバージニア種で高活性を示していることは興味深い。

各酵素の活性量の違いが、原料品種や原産国の気候などによる酵素発現量による違いか、それとも Curing 方法の違いによるものかは、今後検討して明らかにする必要がある。もう一つの視点として、これらの乾燥葉中の酵素活性が、生育中の葉たばこに存在する酵素活性が乾燥過程を経ても残存した結果であるか、それとも乾燥過程で何らかの要因によって誘導されたものであるかは、生化学的に興味深いところである。前者がであれば、酵素タンパク質の構造と安定性が現象解明の鍵となるかもしれない。後者であれば、葉たばこに対する外的刺激（乾燥ストレス、熱ストレス等）と活性誘導という植物生理学的な視点からのアプローチが必要であろう。現象解明のためにまず、葉たばこの乾燥過程における酵素活性の変動について動的に解析し、酵素活性の残存性について考察することを以後の課題としたい。また、インベルターゼに関しては、その活性量と乾燥葉保存中の成分組成の変動（スクロース変動量）との関係が明らかとなったが、他の酵素活性が何の内容成分の変動と関係があるかについて、今後検討していきたい。

第 6 章

総括

植物を素材とする製品・半製品は、その内容成分が時々刻々と変化する。内容成分の経時変化は、対象物が閉鎖系で、且つ完全な化学平衡に達した仮想状態でない限り必ず生じる現象である。素材を貯蔵、熟成、あるいは保管を行う際に、望む変化を生じさせ望まぬ変化を抑制する、すなわち品質管理は食品・嗜好品産業の重要な課題である。経時変化する成分および変化メカニズムの包括的理解は、品質管理上の重要な課題の一つである。

たばこは植物を素材とする嗜好品である。葉たばこは乾燥後も様々な化学成分が経時変化する。乾燥葉中の糖質はたばこ製品の味・香りに関係する重要な成分群であるため、たばこ乾燥葉中の糖質組成およびその変動性について調べることはたばこ乾燥葉の品質管理を行う上で重要な知見となる。本研究ではたばこ乾燥葉に含まれる糖質の経時変化に注目し、その変化メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、化学安定性の高いスクロースが乾燥葉保存中に減少することに焦点をあて、その変化機構について詳細に検討した。以下、各章によって得られた知見を述べる。

本論文の第 2 章において、たばこ乾燥葉中のスクロースの経時変化要因を明らかにした。乾燥葉保存中のスクロースの減少は、酵素反応によって支配されているという仮説を敷いて検討を行った。溶液反応モデルを構築してスクロースの反応性を解析した。たばこ乾燥葉から調製した酵素溶液は、スクロースを自然環境温度程度でも加水分解することを明らかにした。本反応は pH 依存性、温度依存性があり、至適 pH は 5.0、至適温度は 50°C という極大値を示すことから、酵素反応であることが示された。また、本系で生じる加水分解反応を速度論的に解析したところ、酵素反応速度論が適用できることが示唆された。この速度論を利用して、各乾燥葉が有する酵素活性量を定量した。さらに、乾燥葉

の保存試験を実施してスクロースの残存率を確認した。これらの検討の結果、実際の乾燥葉保存中のスクロース残存率は溶液モデルにて定量した酵素活性量と高い相関が認められた。本章における検討結果から、乾燥葉保存中のスクロースの減少は、乾燥葉が有する酵素活性によるものと結論付けた。

第 3 章では、乾燥葉保存中のスクロースの減少について、より詳細なメカニズムを明らかにするために、観測対象とする糖質成分を拡張して種々検討を行った。第 2 章で予見された「加水分解以外の反応スキーム」が乾燥葉保存中に生じている可能性を踏まえ、たばこでは研究例が少ないオリゴ糖について分析した。まず、LC-ESI-MS/MS を用いた新規オリゴ糖分析法を開発した。本分析法は乾燥葉中のマルトオリゴ糖とフルクトオリゴ糖を、それぞれ重合度別に区別して検出、定量することを可能にした。本法を用いてたばこ乾燥葉を分析した結果、両オリゴ糖が種々の乾燥葉に含まれていることを明らかにした。一方で、タバコ植物は過去にフルクトオリゴ糖の存在を否定された経緯があった。実際、本章において葉たばこの凍結乾燥品を分析したところ、フルクトオリゴ糖は検出されなかった。すなわち、フルクトオリゴ糖は、乾燥葉にのみ含まれることを明らかにした。続いて、これらのオリゴ糖について、乾燥葉保存中の変動を確認した結果、温和な環境下でマルトオリゴ糖は減少し、フルクトオリゴ糖は増加することを明らかにした。本章ではさらに、フルクトオリゴ糖が乾燥葉中で生成するメカニズムを一部明らかにした。著者は、フルクトオリゴ糖がスクロースを基質とした酵素反応によって生成していると仮説を立て、いくつかの検証を実施した。結果としてフルクトオリゴ糖は、スクロース加水分解活性を有する乾燥葉がスクロースを含有する場合に、経時的に増加することを明らかにした。すなわち、第 2 章で述べた酵素反応によるスクロースの減少は、加水

分解反応によって消費されると同時に、一部はフルクトシル残基を別分子のスクロースに転移させてフルクトオリゴ糖の生成に寄与していた可能性を示した。

第 4 章では、たばこ乾燥葉中で活性を示すスクロース加水分解酵素の性質について明らかにした。まず、乾燥葉で活性を示すインベルターゼを部分的に精製した。一方で、葉たばこからも酵素液を調製した。乾燥葉から調製した酵素液と、葉たばこから調製した酵素液について、ゲル濾過クロマトグラフィー上における活性の分画の様子を比較した。乾燥葉中には分子量分布が大きく異なるスクロース加水分解活性画分が 3 つあり、少なくとも内 2 つの画分は葉たばこから調製した酵素液中には見られないことを明らかにした。それぞれの活性画分の諸性質を調べた結果、いずれも β-フルクトフラノシル残基を認識し、酸性側に反応至適 pH を持つ酸性インベルターゼに由来することが明らかになった。2 つの活性画分はゲル濾過クロマトグラフィーの溶出時間から、相対分子量が約 300,000 と 590,000 と巨大であった。過去に報告されている植物由来の酸性インベルターゼに関する知見、既報のタバコの cDNA 遺伝情報、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果等から、巨大分子量の活性画分は、他の化合物等との一種の凝集構造であると結論付けた。また、各画分の温度安定性を調べたところ、熱安定性は相対分子量の大きい構造のものほど高いことを明らかにした。また、今回精製したスクロース加水分解活性画分はいずれもスクロースからケストースを生成する機能を有することを明らかにした。この糖転移活性は、スクロース加水分解活性とともに重金属イオンによる阻害作用を受けることを明らかにした。これらの結果から、第 3 章で論じた乾燥葉中のフルクトオリゴ糖の生成は、インベルターゼの副反応によって生じていたことが示唆された。さらに、葉たばこ中では検出されないフルクトオリゴ糖が乾燥葉中では観測され

た理由についても言及した。精製酵素とスクロースの反応性を調べた結果、スクロース濃度の上昇に伴いグルコース生成速度に対する 1-ケストースの生成速度比が高まることが分かった。すなわち、基質濃度が上昇すると、加水分解酵素が起こしえる全反応に対する糖転移反応の割合が向上することが本章の検討から明らかとなった。スクロースが乾燥葉中で高度に濃縮されるという乾燥葉の低水分環境という特殊な反応場が、フルクトオリゴ糖を生成させた理由の一つであると結論付けた。

第 5 章では、スクロース代謝以外に関与する酵素について、その活性残存の有無を検討した。糖質関連酵に焦点を当て、品種（乾燥法）ごとの乾燥葉中の残存する酵素活性を調査した。結果として、α-アミラーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼの活性が乾燥葉に存在することが明らかとなった。これらの酵素活性量を定量し、原料種ごとに比較したところ、原料種によって活性量が異なることが明らかになった。酵素によって活性が高い原料種と低い原料種が異なることも同時に明らかとなった。

本論文では、たばこ乾燥葉中の糖質、特にスクロースに焦点を当てて保存中の経時変化メカニズムについて論じた。たばこ乾燥葉のような高度に加工された植物素材であっても明確な酵素活性が存在した。酵素の存在状態は生育中とは明らかに異なるものであったが、その顕在する触媒活性は主要成分である糖組成を変動させるに十分たるものであった。また、本研究に使用したたばこ乾燥葉の 10– 12wt%という低水分含量であり、その水分活性は低く、微生物が活動するような環境場でない。このような低水分環境下でもインベルターゼは作用し、加水分解反応と糖転移反応の二つの反応が協奏して生じた。この変化機構

は、低水分環境という特殊な環境において成立するものであり、生体植物で起こる生合成機構とは明確に区別されるものであった。

本論文はスクロースとその関連酵素を主軸に論じたものであったが、他にも様々な酵素が乾燥葉中で活性を示し、数多の化合物と複雑な相互作用を起こしているものと考えられる。植物素材の経時変化の包括的な理解のためには、対象成分、対象酵素を拡張したさらなる研究の発展が望まれる。また、葉たばこ乾燥中の酵素タンパク質の変化を動的に解析することにより、乾燥葉中の酵素の状態に関するより深い理解が得られるものと考えられる。

本研究で得られた知見は、たばこ乾燥葉の品質管理を行う上で重要であるだけでなく、加工植物を扱う業界全般に適用しうるものと考えられる。植物を高度に加工する、特に植物を乾燥して使用する例は、たばこ以外に様々なものがある。たとえば、茶、干し野菜、ドライフラワーはその代表的な例である。植物の乾燥は、素材の保存性を向上させるための代表的な手法であるが、乾燥した後も保存状態次第でその内容成分は十分に変動しうる。時としてその変化要因は残存酵素による事が考えられる。さらに、植物の生育中には生じない反応が乾燥した素材の保存中には生じうる。現在、本研究で得られた知見をもとに、たばこ製造プロセスが見直されつつある。本研究で得られた成果は、たばこ乾燥葉の品質管理技術の向上だけでなく、食品加工学の発展に貢献するものと考えられる。

参考文献

五明紀春，品川弘子，吉田企世子，古我可一，前田安彦：食品加工学－加工貯蔵の理論と実際．学文社 (2006).

たばこ総合研究センター(TASC)：たばこの辞典．山愛書院 (2009).

並木満夫，松下雪郎：食品の品質と成分間反応．講談社サイエンティフィク (1990).

村田容常：酵素的褐変とその制御．化学と生物, 45, 403– 410 (2007).

村田容常，本間清一：ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御－最近の研究動向．日本食品科学工学会誌, 45, 177– 185 (1998).

千葉誠哉： α-グルコシダーゼとグルコアミラーゼ．*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, **69**, 1050– 1054 (1995).

Abbott, I. R., and Matheson, N. K.: Starch depletion in germinating wheat, wrinkled-seeded peas and senescing tobacco leaves. *Phytochemistry*, **11**, 1261– 1272 (1972).

Abubakar, Y., Young, J. H., Johnson, W. H., and Weeks, W. W.: Changes in moisture and chemical composition of flue-cured tobacco during curing. *Tob. Sci.*, **44**, 51– 58 (2000).

Agopian, R. G. D., Purgatto, E., Cordenunsi, B. R., and Lajolo, F. M.: Synthesis of fructooligosaccharides in banana ‘Prata’ ana its relation to invertase activity and sucrose accumulation. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10765– 10771 (2009).

Bahr, U., Pfenninger, A., and Karas, M.: High-sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **69**, 4530– 4535 (1997).

Baker, R. R.: Smoke chemistry, p. 398− 439. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Baker, R. R., Pereira da Silva, J. R., and Smith, G.: The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives. *Food Chem. Toxicol.*, **42S**, S3− S37 (2004a).

Baker, R. R., Pereira da Silva, J. R., and Smith, G.: The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part II: Casing ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, **42S**, S39− S52 (2004b).

Banguela, A., and Hernández, L.: Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnol. Apl.*, **23**, 202− 210 (2006).

Barrett, R. E.: Tobacco Aging, Enzymes of Bright and Burley Tobaccos. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, 220− 224 (1957).

Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarzewski, J., and Panel, C.: The novel non-glycosylated invertase from Candida utilis (the properties and the conditions of production and purification). *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 40− 53 (2002).

Biggs, D. R., and Hancock, K. R.: Fructan 2000 *Trends Plant Sci.*, **6**, 8− 9 (2001).

Bourne, E. J., Pridham, J. B., and Worth, H. G. J.: Pectic substances in cured and uncured tobacco. *Phytochemistry*, **6**, 423− 431 (1967).

Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248− 254 (1976).

Cairns, A. J., and Ashton. J. E.: The interpretation of in vitro measurements of fructosyl transferase activity: an analysis of patterns of fructosyl transfer by fungal

invertase. *New Phytol.*, **118**, 23− 34 (1991).

Campbell, J. M., Bauer, L. L., Fahey, G. C. Jr., Hogarth, A. J. C. L., Wolf, B. W., and Hunter, D. E.: Selected fructooligosaccharide (1-kestose, nystose, and 1^F-*β*-fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3076− 3082 (1997).

Clarke, M. B., Bezabeh, D. Z., and Howard, C. T.: Determination of carbohydrates in tobacco products by liquid chromatography−Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: A comparison with ion chromatography and application to product discrimination. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1975− 1981 (2006).

Dixon, L. F., Darkis, F. R., Wolf, F. A., Hall, J. A., Jones, E. P., and Gross, P. M.: Flue-cured tobacco: natural aging of flue-cured cigarette tobaccos. *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 180− 189 (1936).

Ende, W. V. D., and Laere, A. V.: Purification and properties of an invertase with surose:sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of Cichorium intybus L. *New Phytol.*, **12**, 31− 37 (1993).

Fotopoulos, V.: Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *J. Biol. Res.*, **4**, 127− 137 (2005).

Frankenburg, W. G.: Chemical Changes in the Harvested Tobacco Leaf. I. Chemical and Enzymatic Conversations during the Curing Process. *Advances in Enzymolozy*, **Volume VI**, **6**, 309− 387 (1946).

Frankenburg, W. G.: Chemical Changes in the Harvested Tobacco Leaf. II. Chemical and Enzymatic Conversations during Fermentation and Aging. *Advances in Enzymolozy*, **Volume X**, **6**, 325− 434 (1950).

French, D.: Isolation and identification of planteose from tobacco seeds. *J. Am. Chem.*

Soc., **77**, 1024− 1025 (1955).

Friedmann, M.: Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 631− 653 (1996).

Gager, F. L., Nedlock, J. W., and Martin, W. J.: Tobacco additives and cigarette smoke. I. Transfer of D-glucose, sucrose, and their degradation products to the smoke. *Carbohydr. Res.*, **17**, 327− 333 (1971a).

Gager, F. L., Nedlock, J. W., and Martin, W. J.: Tobacco additives and cigarette smoke. II. Organic, gas-phase products from D-glucose and sucrose. *Carbohydr. Res.*, **17**, 327− 333 (1971b).

Garozzo, D., Giuffrida, M., Impallomeni, G., Ballistreri, A., and Montaudo, G.: Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **62**, 279− 286 (1990).

Ghazi, I., Fernández-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., and Plou, F. J.: Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase form Aspergillus aculeatus. *J. Biotechnol.*, **128**, 204− 211 (2007).

Gilchrist, S. N.: Production practices: Oriental tobacco, p. 154− 163. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Greiner, S., Weil, M., Krausgrill, S., and Rausch, T.: A tobacco cDNA coding for cell-wall invertase. *Plant Physiol.*, **108,** 825− 826 (1995).

Hall, R. A., and Wooten, J. B.: Quantitative analysis of cellulose in tobacco by ^{13}C CPMAS NMR. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1423− 1427 (1998).

Hendry, G. A. F.: Evolutionary origins and natural functions of fructans - a

climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.*, **123**, 3– 14 (1993).

Henry, R. J., and Darbyshire, B.: Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *allium cepa. Phytochemistry*, **19**, 1017– 1020 (1980).

Hodge, J. E.: Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 928– 943 (1953).

Hogarth, A. J. C. L., Hunter, D. E., Jacobs, W. A., Garleb, K. A., and Wolf, B. W.: Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5326– 5330 (2000).

Homma, S., Terasawa, N., Kubo, T., Yoneyama-Ishii, N., Aida, K., and Fujimaki, M.: Changes in chemical properties of melanoidin by oxidation and reduction. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 533– 535 (1997).

Ishimoto, M., and Nakamura, A.: Purification and properties of β-fructofuranosidase from Clostridium perfringens. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 599– 603 (1997).

Jay, G. D., Culp, D. J., and Jahnke, M. R.: Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Anal. Biochem.*, **185**, 324– 330 (1990).

Lee, H. S., and Sturm, A.: Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiol.*, **112**, 1513– 1533 (1996).

Leffingwell, J. C.: Leaf chemistry: basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types, p. 265– 284. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Linbo, S., Torri, L., and Piergiovanni, L.: Light-induced changes in an aqueous beta-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5238− 5245 (2007).

Liu, Y., Urgaonkar, S., Verkade, J. G., and Armstrong, D. W.: Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, **1079**, 146− 152 (2005).

Lopez, M. E., Vattuone, M. A., and Sampietro, A. R.: Partial purification and properties of invertase carica papaya fruits. *Phytochemistry*, **27**, 3077− 3081 (1988).

Lüscher, M., Hochstrasser, U., Boller, T., and Wiemken, A.: Isolation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from barley (Hordeum vulgare). *New Phytol.*, **145**, 225− 232 (2000).

Maharaj, V., and Sankat, C. K.: Quality changes in dehydrated dasheen leaves: effects of blanching pre-treatments and drying conditions. *Food Res. Int.*, **29**, 563− 568 (1996).

Maillard, L. C.: Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, **154**, 66− 68 (1912).

Mauri, P., Minoggio, M., Simonetti, P., Gardana, C., and Pietta, P.: Analysis of saccharides in beer samples by flow injection with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 743− 748 (2002).

Mizuno, T., and Kinpyo, T.: Studies on the carbohydrates on tobacco. Part I: Free sugars and the constructive sugars of glycosides in green leaves of Japanese bright yellow tobacco. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 297− 299 (1957).

Momma, M.: Cloning and sequencing of the maltohexaose-producing amylase gene of

Klebsiella pneumonia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 428– 431 (2000).

Moreno, F. J., Corzo-Martı´nez, M., Del Castillo, M. D., and Villamiel, M.: Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Res. Int.*, **39**, 891– 897 (2006).

Nakamura, M., Hagimori, M., and Matsumoto, T.: Purification and characterization of acid invertase from cultured tobacco cells. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3157– 3158 (1988).

Nakanishi, K., and Yokotsuka, K.: Characterization of thermostable invertase from wine grapes. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 16– 22 (1990).

Negi, P. S., and Roy, S. K.: Effect of drying conditions on quality of green leaves during long term storage. *Food Res. Int.*, **34**, 283– 287 (2001).

Oakley, E. T.: Enzymatic determination of starch in fresh green, lyophilized green, and cured tobacco. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 902– 905 (1983).

Obenland, D. M., Simmen, U., Boller, T., and Wiemken, A.: Purification and characterization of three invertases from barley (Hordeum vulgare L.) leaves. *Plant Physiol.*, **101**, 1331– 1339 (1993).

Palmer, G. K., and Pearce, R. C.: Production practices: Light air-cured tobacco, p. 143– 153. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Peedin, G. F.: Production practices: Flue-cured tobacco, p. 104– 142. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Penna, N., Capellacci, S., Ricci, F., Giorgi, M., Penna, A., Famiglini, G., Pierini, E., Kazmaier, T., Roth, S., Zapp, J., Harding, M., and Kuhn, R.: Quantitative analysis

of malto-oligosaccharides by MALDI-TOF mass spectrometry, capillary electrophoresis and anion exchange chromatography. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **361**, 473– 478 (1998).

Pilon-Smits, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J., and Smeekens, S. C. M.: Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant physiol.*, **107**, 125– 130 (1995).

Prabhu, S., and Chakraborty, M.: Development of aroma-bearing compounds and their precursors in flue-cured tobacco during curing and post-curing operations. *Tob. Res.*, **12**, 175– 185 (1986).

Pranznik, W., Beck, R. H. F., and Spies, T.: Isolation and characterization of sucrose:sucrose 1^F-β-D-fructosyltransferase tubers of helianthus tuberosus L. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2429– 2431 (1990).

Pressey, R.: Inhibition of invertases by pyridoxal and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 414– 416 (1968).

Pucher, G. W., and Vickery, H. B.: The metabolism of the organic acids of tobacco leaves; effect of culture of excised leaves in solutions of organic acid salts. *J. Biol. Chem.*, **178**, 557– 575 (1949).

Reinskje, T., Antoon, O., and Amsterdam, J. G. C.: Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1789– 1798 (2006).

Robyt, J. F., and Ackerman, R. J.: Isolation, purification, and characterization of a maltotetraose-producing amylase from *Pseudomonas stuzeri. Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 105– 114 (1971).

Ritsema, T., and Smeekens, S.: Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin.*

Plant Biol., **6**, 223− 230 (2003).

Schägger, H., and Jagow, G. V.: Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223− 231 (1991).

Seipert, R. R., Barboza, M., Niñonuevo, M. R., LoGascio, R. G., Mills, D. A., Freeman, S. L., German, J. B., and Lebrilla, C. B.: Analysis and quantitation of fructooligosaccharides using matrix-assusted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **80**, 159− 165 (2008).

Sheen, S. J., and Calvert, J.: Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in three tobacco types. *Plant Physiol.*, **44**, 199− 204 (1969).

Shiomi, N.: Food biochemical study on fructans and related synthesis enzymes. *J. Appl. Glycosci.*, **55**, 25− 33 (2008).

Siddiqui, I. R., and Rosa, N.: Low molecular weight carbohydrates of tobacco. *Tob. Sci.*, **27**, 130-134 (1983).

Silván, J. M., Lagemaat, J. V. D., Olano, A., and Castillo, M. D. D.: Analysis and biological properties of amino acid derivates formed by Maillard reaction in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **4**, 1543− 1551 (2006).

Smaniotto, A., Bertazzo, B., Comai, S., and Traldi, P.: The role of peptides and proteins in melanoidin formation. *J. Mass. Spectrom.*, **44**, 410− 418 (2009).

Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T., and Wiemken, A.: Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11652− 11656 (1995).

Sprenger, N., Schellenbaum, L., Dun, K. V., Boller, T., and Wiemken, A.: Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase. *FEBS Lett.*, **400,** 355− 358 (1997).

Stedman, R. L.: The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem. Rev.*, **68**, 153− 207 (1968).

Sturm, A.: Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.*, **121**, 1− 7 (1999).

Sun, J., Yan, T., Tu, S., He, J., Si, H., Xie, H., and Wu, F.: Establishment and application of enzymological models for predicting quality of flue-cured tobacco. *J. Food Agric. Environ.*, **8**, 326− 331 (2010).

Švob Troje, Z., Fröbe, Z., and Perović, Đ.: Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. *J. Chromatogr., A*, **775**, 101− 107 (1997).

Tabata, S., and Dohi, Y.: An assay for oligo-(1→4)→(1→4)-glucantransferase activity in the glycogen debranching enzyme system by using HPLC with a pulsed amperometric detector. *Carbohydr. Res.*, **230**, 179− 183 (1992).

Tang, K., Liang, L., Cai, Y., and Mou, S.: Determination of sugars and alditols in tobacco with high performance anion-exchange chromatography. *J. Sep. Sci.*, **30**, 2160− 2166 (2007).

Terrill, T.: Influence of harvesting variables. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, **62,** 85− 92 (1974).

Tomasik, P., Palasiński, M., and Wiejak, S.: The thermal decomposition of carbohydrates. Part I. The decomposition of mono-, di-, and oligo-saccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **47**, 203−278 (1989).

Tomás-Barberán, F. A., and Espín, J. C.: Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 853–876

(2001).

Troller, J. A., and Christian, J. H. B.: 食品と水分活性. 学会出版センター (1981).

Trufelli, H., and Cappiello, A.: Study on the maltooligosaccharide composition mucilage samples collected along the northern Adriatic coast. *Carbohydr. Res.*, **344**, 120− 126 (2009).

Tso, T. C.: Seed to smoke, p. 1-31. *In Tobacco*: Production Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Vanderhaegen, B., Neven, H., Varachtert, H., and Derdelinckx, G.: The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.*, **95**, 357− 381 (2006).

Vandermaarel, M. J. E. C., Vanderveen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L.: Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *J. Biotechnol.*, **94**, 137− 155 (2002).

Vergauwen, R., Van Laere, A., and Van den Ende, W.: Properties of Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferases from Chicory and Globe Thistle, Two Asteracean Plants Storing Greatly Different Types of Inulin. *Plant Physiol.*, **133**, 391− 401 (2003).

Vickert, H. B., and Abrahams, M. D.: The metabolism of the organic acids of tobacco leaves; effect of culture of excised leaves in solutions of d-isocitrate and acetate. *J. Biol. Chem.*, **180**, 37− 45 (1949).

Wahlberg, I., Kerstin, K., Austin, D. J., Junker, D., Roeraade, J., Enzell, C. R., and Johnson, W. H.: Effects of flue-curing and ageing on the volatile, neutral and acidic constituents of Virginia tobacco. *Phytochemistry*, **16**, 1217− 1231 (1977).

Wang, J., Sporns, P., and Low, N. H.: Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1549-1557 (1999).

Weeks, W. W.: Leaf chemistry: relationship between leaf chemistry and organoleptic properties of tobacco smoke, p. 304–312. *In Tobacco*: Production, Chemistry and Technology, Davis, D. L., Nielsen, M. T., Eds.; Blackwell Science: Oxford, U.K. (1999).

Weston, T. J.: Biochemical characteristics of tobacco leaves during flue-curing. *Phytochemistry*, **7**, 921− 930 (1968).

Young, J. R., and Jeffrey, R. N.: Changes in certain water-soluble nitrogenous constituents of burley tobacco during storage. *Plant Plysiol.*, **18**, 433− 438 (1943).

Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **30**, 148− 152 (1969).

謝辞

本研究をまとめるにあたり、九州大学生物資源環境科学府 割石博之教授に懇篤なるご指導ご鞭撻をいただきました。ここに心から深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、貴重なご指導、ご助言を賜りました九州大学 農学研究院 久原哲教授、堤祐司教授、石野良純教授、一瀬博文助教に厚く御礼申し上げます。そして、本研究を遂行するにあたり、いつも丁寧にご指導いただきました日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンター（現：製品科学部チームリーダー）山本岳博士に謹んで深く御礼申し上げます。

酵素の研究を行うにあたり、並々ならぬ御協力をいただいた日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンターの方々、植木潤所長、峯利喜博士、岡一郎氏、須山桂志氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださいました、たばこ中央研究所　大久保和也チームリーダー（現：品質分析部チームリーダー）に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にご賛同いただき、方面でご協力いただきました日本たばこ産業株式会社たばこ中央研究所、米田靖之所長（現：R&D 責任者）、北尾智所長、志方比呂基 R&D 企画部長（現：製品技術開発部長）、三浦圭吾副所長（現：R&D 企画部長）、佐々木隆副所長、小早川洋一シニアリーダー、稲垣道弘チームリーダー、長尾淳史チームリーダーに御礼申し上げます。

葉たばこ中の酵素に関してご教授、ご教示を戴きました、日本たばこ産業株式会社葉たばこ研究所所員の方々、山口直人研究員（現：原料統括部 原料技術部）、増田紳吾研究員に深く感謝いたします。

たばこ乾燥葉中の成分変化に関して、速度論的解釈について議論いただき、また研究の心得についてご講釈賜りました坂本幸司博士に謝意を表します。

代謝システムデザイン研究室の皆様、生物産業キャリアパス設計教育プログラム支援室の皆様、日本たばこ産業株式会社の伊藤研児博士、佐藤慎介博士、和木幸子氏には方面で大変お世話になりました。最後に、本研究課題の発足から完遂まで、酵素学を共に学び、終始励ましをいただきました川瀬麻里氏に、謹んで御礼申し上げます。